



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Recuperación de proteínas del suero de leche utilizando
quitosán**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A:**

HELIA ISAURA PERALTA SÁNCHEZ

**ASESORA DE TESIS:
DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO
DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Recuperación de proteínas del suero de leche utilizando quitosán.

Que presenta la pasante: **Helia Isaura Peralta Sánchez**

Con número de cuenta: 310748175 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

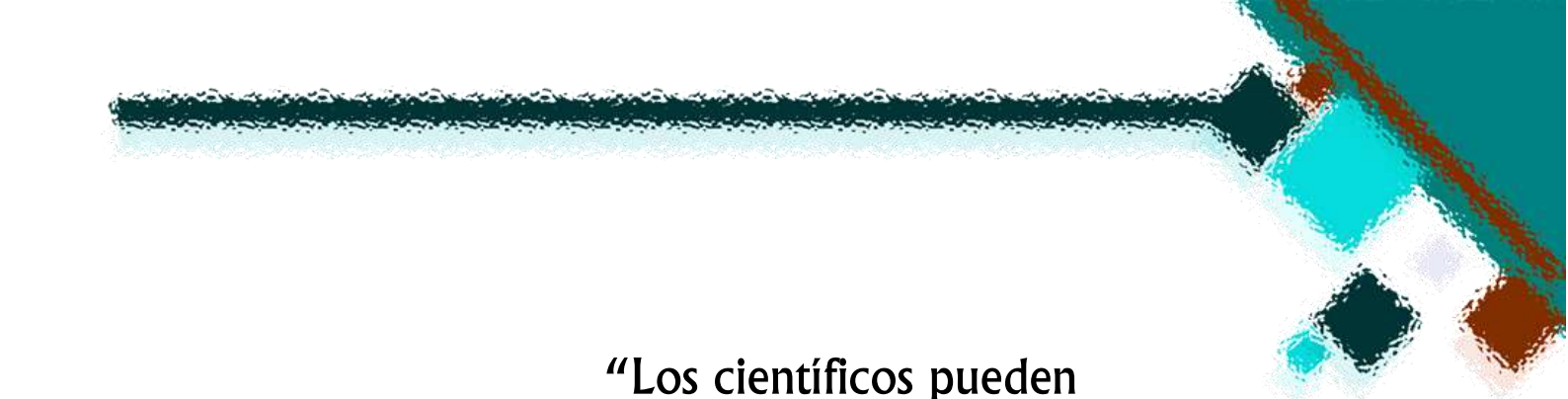
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Febrero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Julieta González Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



“Los científicos pueden plantear los problemas que afectarán al medio ambiente con base en la evidencia disponible, pero su solución no es responsabilidad de los científicos, es de toda la sociedad.”

Mario Molina

“El camino del progreso no es ni rápido ni fácil.”

Marie Curie

“Libre, y para mi sagrado, es el derecho de pensar...

La educación es fundamental para la felicidad social; es el principio en el que descansan la libertad y el engrandecimiento de los pueblos”

Benito Juárez

Agradecimientos

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro por su paciencia, su asesoría, gracias por todo el tiempo de aprendizaje en el laboratorio, por el crecimiento que tuve como persona y profesionista y por la confianza que depositó en mí a lo largo del proyecto.

A la I.A. Daniela Hernández Regino por su infinita paciencia, enseñanzas y gran colaboración durante todo el proyecto, gracias por todos los consejos que me brindaste y sobre todo la gran amistad que se formó durante las largas horas de experimentación.

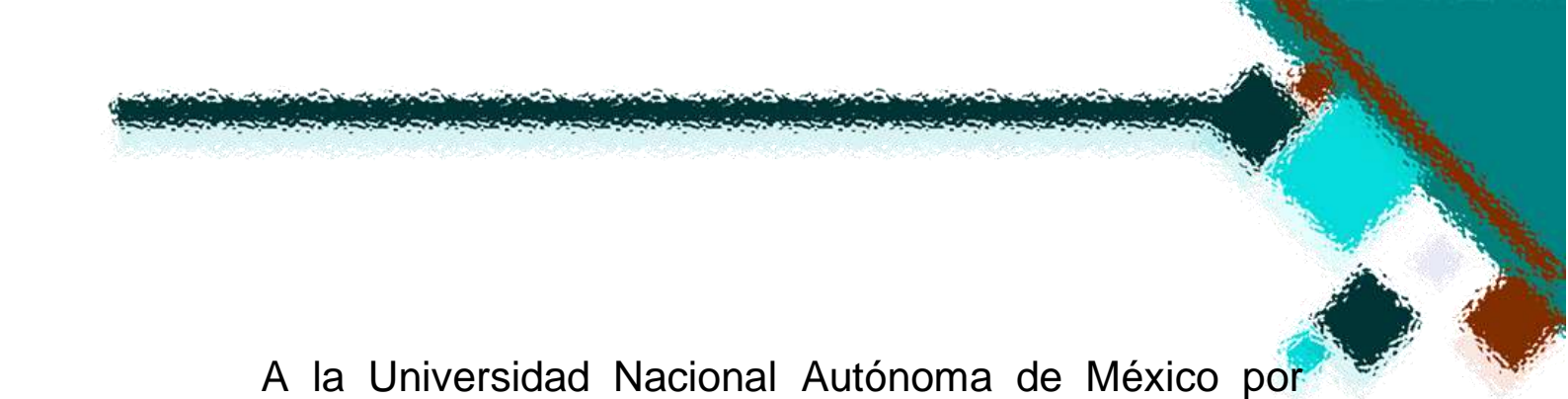
A mis compañeras y amigas del taller Bibi y Marisol por el apoyo durante la experimentación no hubiera sido lo mismo sin ustedes, gran por su amistad y los buenos momentos que pasamos en el laboratorio.

A mis amigas de la Universidad, a Fer por estar a mi lado durante toda la carrera, a Tania por su ejemplo de perseverancia y motivación constante, a Karla, Ara, Karen, Bianca, Brenda, por su apoyo y amistad, por todas las experiencias vividas a lo largo de este viaje.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por todos los recursos brindados a lo largo de estos 5 años, y por su colaboración directa para el presente proyecto al Taller Multidisciplinario de Ingeniería en Alimentos de Biotecnología, al laboratorista Juan, al taller de lácteos en campo 4, a la Dra. Elsa Gutiérrez, a la Dra. Susana Mendoza Elvira gracias por el apoyo técnico y los recursos que facilitaron la realización de este proyecto.

A mis sinodales, Dr. Francisco Montiel Sosa, M. en C. Tais Nopal Guerrero, I.A. Miriam Álvarez Velasco, M. en C. Julieta González Sánchez, gracias por su dedicación y apoyo en la realización de este trabajo, por ser un ejemplo a seguir y por los conocimientos transmitidos dentro y fuera del aula.

A todos los profesores que demuestran la calidad de esta Universidad que contribuyeron con mi educación y formación profesional gracias por los conocimientos transmitidos y la motivación durante la carrera.



A la Universidad Nacional Autónoma de México por impulsar el talento en México y por los infinitos recursos me brindó a lo largo de la carrera, gracias por hacerme una profesionista con amplio criterio.

A mis padres por darme la vida, por su apoyo incondicional, por darme la oportunidad de estudiar en esta gran Universidad, por los valores que me han enseñado, por el ejemplo de perseveración, por todo el tiempo que han dedicado a mi desarrollo personal y profesional, la motivación constante, por convertir los momentos difíciles en momentos de reflexión y aprendizaje, por enseñarme lo importante en la vida y lo importante que es valorar el esfuerzo, porque los tiempos difíciles no lo son tanto con la familia que ustedes construyeron, todo lo que soy y llegaré a ser es gracias a ustedes, gracias por su amor infinito.

A mi hermana por ser un claro ejemplo de constancia, disciplina y perseverancia, porque me enseñaste que no es fácil, pero los sueños se logran, por tu coraje, por siempre ser mi cómplice en las buenas y en las malas, porque se que siempre contaré contigo sin importar la distancia al igual que tu siempre contarás conmigo, muchas gracias.

Contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
Capítulo 1. Antecedentes	4
1.1 Suero de leche	5
1.1.1 Definición	5
1.1.2 Obtención.....	5
1.1.2.1 Suero dulce.....	7
1.1.2.2 Suero ácido.....	7
1.1.3 Composición	8
1.1.4 Producción de suero de leche.....	9
1.1.5 Contaminación del agua por suero de leche.....	10
1.1.6 Aplicaciones del suero de leche.....	13
1.1.6.1 Suero en polvo	13
1.1.6.2 Desmineralización	13
1.1.6.1 Alimentación animal	14
1.1.6.2 Recuperación de lactosa.....	14
1.1.6.3 Producción de alcohol.....	14
1.1.6.4 Producción de ácido láctico	14
1.1.6.5 Producción de biofertilizantes	15
1.1.6.6 Películas comestibles.....	15
1.1.6.1 Bebidas.....	16
1.2 Proteínas lácteas	16
1.2.1 Evaluación.....	17
1.2.1.1 Método de Bradford.....	17
1.2.1.2 Método Kjeldahl.....	18
1.2.1.3 Análisis electroforético	20
1.2.2 Clasificación	20
1.2.2.1 Caseínas.....	21
1.2.2.2 Proteínas del suero	22
β-lactoglobulina	23
α-lactoalbumina.....	24

Inmunoglobulinas	25
Proteosa-Peptona	25
Albúmina sérica.....	25
Lactoferrina	26
1.2.3 Recuperación.....	26
1.2.3.1 Tratamientos térmicos.....	27
1.2.3.2 Membranas de intercambio iónico	28
1.2.3.3 Ultrafiltración y microfiltración	28
1.2.3.4 Precipitación por formación de complejos (Interacción proteína-polisacárido).....	29
1.2.4 Propiedades funcionales y nutricionales de proteínas	30
Espumante	31
Emulsificante	31
Formación de geles.....	31
1.3 Quitosán	32
1.3.1 Estructura.....	32
1.3.2 Extracción	35
1.3.3 Solubilidad.....	38
1.3.4 Aplicaciones.....	38
Tratamientos de aguas industriales y efluentes.....	38
Medicina	39
Agricultura	39
Uso en alimentos y propiedades funcionales.....	40
1.3.5 Polieléctrolito.....	41
Capítulo 2. Metodología	42
2.1 Cuadro metodológico	43
2.2 Objetivo general	44
2.2.1 Objetivo Particular 1	44
2.2.2 Objetivo Particular 2	44
2.3 Actividades preliminares	44
2.3.1 Suero de leche.....	44
2.3.1.1 Obtención del suero de leche.	44
2.3.1.2 Caracterización del suero de leche.....	47

2.3.2	Quitósán.....	50
2.3.2.1	Preparación de la solución de quitósán.....	50
2.4	Aislamiento de las proteínas de suero de leche utilizando quitósán. ...	51
2.5	Determinación de proteínas.....	54
2.6	Análisis electroforético (SDS-PAGE).....	56
2.7	Diseño estadístico.....	59
Capítulo 3.	Resultados y discusión.....	62
3.1	Actividades preliminares.....	63
3.2	Objetivo particular 1.....	65
3.3	Objetivo particular 2.....	70
Conclusiones	73
Recomendaciones	74
Referencias	75
Apéndice	A

Índice de figuras

Figura 1.	Elaboración de queso.....	6
Figura 2.	El mercado del suero lácteo.....	9
Figura 3.	Países productores de suero lácteo.....	9
Figura 4.	Aplicaciones del suero de leche.....	12
Figura 5.	Espectro de absorción del complejo proteína-azul Coomassie G-250.....	18
Figura 6.	Digestión para micro Kjeldahl.....	19
Figura 7.	Clasificación de las proteínas lácteas.....	21
Figura 8.	Complejo β -lactoglobulina- κ -caseína.....	22
Figura 9.	Diagrama de β -lactoglobulina.....	24
Figura 10.	Estructura de α -lactoalbumina.....	25
Figura 11.	Estructura del quitósán.....	33
Figura 12.	Desacetilación de la quitina.....	34
Figura 13.	Desacetilación enzimática.....	37
Figura 14.	Glucosamina en quitósán.....	41
Figura 15.	Centrifuga de discos ensamblada.....	46
Figura 16.	Centrifuga de discos en funcionamiento.....	46

Figura 17. Grasa del suero	46
Figura 18. Método Gerber	48
Figura 19. Diagrama general del proceso de aislamiento de las proteínas de suero de leche utilizando quitosán como agente de precipitación	51
Figura 20. Calibración de tubos.....	53
Figura 21. Centrifugación	53
Figura 22. Muestra centrifugada	53
Figura 23. Precipitado.....	53
Figura 24. Muestra para curva patrón Bradford.....	55
Figura 25. Lectura de absorbancia.....	55
Figura 26. Curva patrón Bradford.....	56
Figura 27. Pesos moleculares electroforesis	58
Figura 28. Cámara de electroforesis	59
Figura 29. Transluminador y cámara Kodak	59
Figura 30. Análisis electroforético	71

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del suero de leche	9
Tabla 2. Proteínas del suero de leche.....	23
Tabla 3. Características del quitosán	32
Tabla 4. Curva patrón Bradford	55
Tabla 5. Diseño experimental para la precipitación de proteínas con quitosán..	61
Tabla 6. Caracterización del suero de leche.....	64
Tabla 7. Cantidad de precipitado con quitosán.....	65
Tabla 8. Proteína obtenida y rendimiento	66

Índice de gráficas

Gráfico 1. Contenido de nitrógeno vs grado desacetilación	35
Gráfico 2. Efectos principales para medias.....	67

Resumen

El objetivo de este proyecto fue evaluar el rendimiento del uso del quitosán para la recuperación de proteínas de suero de leche, para esto se cuantificó la cantidad de proteína precipitada, así mismo se realizó un análisis electroforético para determinar el tipo de proteínas obtenidas. Se utilizó suero de leche obtenido a partir de la elaboración de queso Oaxaca, el cual fue desgrasado previo al proceso de recuperación de proteínas. Se usaron tres variables, con tres niveles de variación, concentración de quitosán añadida (1,000 mg/L suero, 2,000 mg/L y 3,000 mg/L), tiempo de centrifugación (10, 20 y 30 minutos) y pH del suero de leche (5.5, 6 y 7). Con los resultados obtenidos se establecieron las condiciones con las que se logró un mayor rendimiento.

Introducción

La distribución y procesamiento de los alimentos se ha convertido en una industria sofisticada, intensiva y mecanizada, que ha llevado al aumento de la productividad y eficiencia, sin embargo, en los últimos años la creciente preocupación por la calidad del producto, la conservación y la sustentabilidad, han llevado a la demanda de sistemas productivos sustentables, amigables con el ambiente y eficientes con los recursos. Desechos y subproductos que exceden la capacidad natural para ocuparse de ellos guían a la alteración ambiental. Si los nutrientes de dichos subproductos pudieran ser recuperados, o los desechos mismos pudieran ser convertidos en compuestos útiles para los animales, humanos, plantas, etc, entonces los recursos nutricionales y/o funcionales incrementarían y al mismo tiempo se minimizaría el problema de eliminación de desechos (Knorr, 1983).

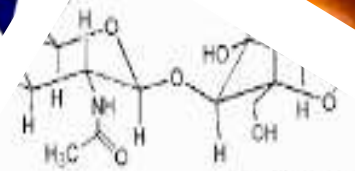
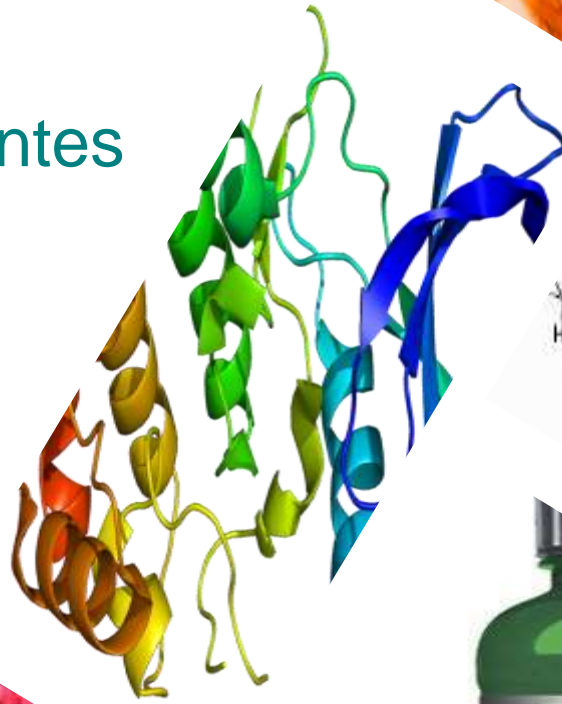
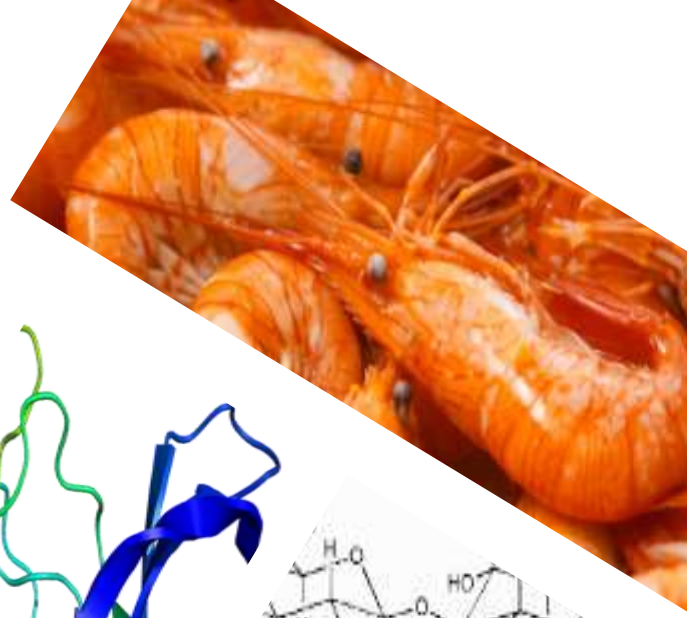
Por un lado, el suero de leche, principal subproducto de la industria láctea, que se genera durante la fabricación de queso, aunque algunas veces resulta de la producción de caseína por el proceso de coagulación (Das et al., 2016), es un desecho importante, ya que para generar 1 kg de queso se deben desechar 9 L de suero, además el alto contenido en lactosa, altos índices de BOD (30,000-50,000 ppm) y COD (60,000-80,000) (por sus siglas en inglés demanda biológica y orgánica de oxígeno respectivamente), sugiere un gran problema de contaminación del agua (Savant & Torres, 2000), a su vez también representa una pérdida de nutrientes. Aunque la composición nutricional del suero de leche puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso (Poveda E., 2013). En general, el lactosuero contiene de un 6-10% de sustancias sólidas (Alomirah & Alli, 2004), las cuales representan aproximadamente un 50-55% de las que originalmente contiene la leche (Casal et al., 2006; Zall, 1967). El suero de leche provee beneficios a la salud de hombres de todas las edades, al proveer componentes bioactivos específicos, las actividades biológicas son atribuidas principalmente a péptidos específicos contenidos en las proteínas. Alimentos para bebés, productos hipo alergénicos, bebidas nutracéuticas, han promovido la selección y desarrollo de métodos de aislamiento y concentración de las proteínas de lactosuero. Los métodos de precipitación son utilizados generalmente en el laboratorio para obtener concentrados proteicos o la producción de péptidos. Se ha demostrado que variables como la agitación, el tiempo de reposo y la concentración del precipitante afectan el pH de la solución y por lo tanto la conformación de la proteína (Jiménez et al., 2012).

Por otra parte, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) informó que la producción de camarón en el país aumentó en 65.5 por ciento durante los últimos cuatro años, por lo que este crustáceo se ubicó como el segundo en importancia entre los productos pesqueros del país, teniendo en cuenta que la merma de este producto es de 15-30%, se genera una gran cantidad de desechos contaminantes, sin embargo, de la cáscara de algunos crustáceos como el camarón se extrae la quitina y tras un procedimiento de desacetilación resulta en quitosán (Rinaudo, 2006). El quitosán es un polímero cuyas propiedades destacables son la aceleración de la cicatrización de heridas, efecto anti-picor, agente antimicrobiano, acción hidratante (Wypych, 2016) además su naturaleza catiónica lo hace un candidato ideal para aplicaciones en alimentos así como el procesamiento de aguas residuales, purificación del agua, clarificación de bebidas además de la recuperación de células y proteínas (Savant & Torres, 2000).

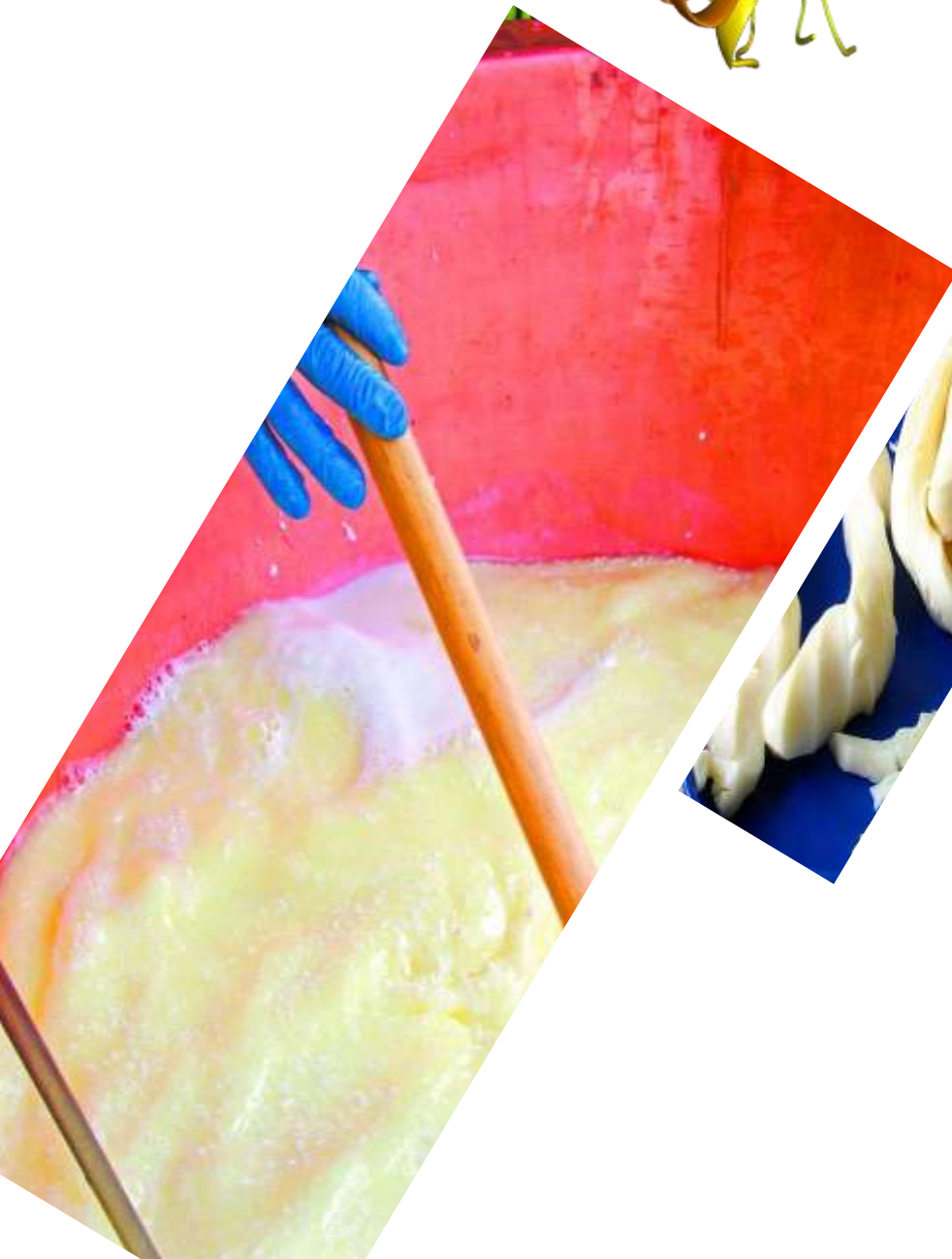
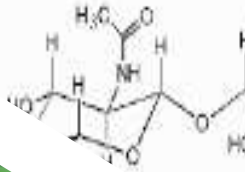
La industria alimentaria es responsable de la gestión sostenible y del uso eficiente de los recursos naturales para aprovecharlos de manera adecuada, es por ello que en la última década se han buscado sistemas de producción que permitan reducir el uso desmesurado e ineficiente de los alimentos y pérdida de nutrientes, así como la disminución de los efectos adversos hacia la salud y el medio ambiente ocasionados por los desechos generados, en el caso específico del suero lácteo y cáscara de camarón se ha demostrado que a partir de ellos se pueden obtener elementos con propiedades funcionales útiles para la industria y de alto valor nutricional, es por ello que en este estudio se propone la recuperación de las proteínas de suero de la leche mediante la precipitación de las mismas utilizando un polisacárido extraído de los crustáceos conocido como quitosán.

Capítulo 1

Antecedentes



QUITINA



1.1 Suero de leche

1.1.1 Definición

De acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010 y PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2011 el suero de leche se define como el líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína durante la elaboración del queso y/o la caseína. Su composición varía en función de la leche utilizada, el tipo de queso del cual proviene, del método de coagulación y de los procesos a los que es sometido para obtener propiedades funcionales específicas. Puede ser dulce o ácido según el pH que presente (COFOCALEC, 2012).

Para la elaboración de 1 kg de queso se estima que se generan cerca de 9 L de suero, usualmente se ha considerado a este subproducto lácteo como un desecho por lo que se descarta de la forma más económica posible, como por ejemplo vertiéndose al drenaje, lo cual es un problema ambiental, o bien es procesado como producto de un valor relativamente bajo (Montoya et al., 2014).

1.1.2 Obtención

El suero de leche es un líquido diluido que contiene lactosa, proteínas, minerales, trazas de grasa, aproximadamente 6% de sólidos totales de los cuales 70% o más es lactosa y aproximadamente 0.7% proteínas (Zall, 1967). Diferentes variedades de queso producen diferentes tipos de suero de leche, comúnmente es clasificado por su acidez total, así el suero puede ser clasificado como suero dulce cuando se generan pequeñas cantidades de ácido láctico, es decir cuando es el subproducto de la elaboración de quesos duros, semi-duros, suave y queso de cuajo (como el queso Cheddar o Edam), este suero contiene un pH entre 5-7. En contraste el suero ácido, que se encuentra en rangos de pH entre 4-5 ya que contienen una mayor cantidad de ácido láctico o ácido mineral añadido, es subproducto de la fabricación de queso cottage, queso crema, entre otros (Moraes Da Fonseca, 1999).

La fabricación de quesos, en general, comprende 4 grandes etapas, las cuales se ilustran en la figura 1:

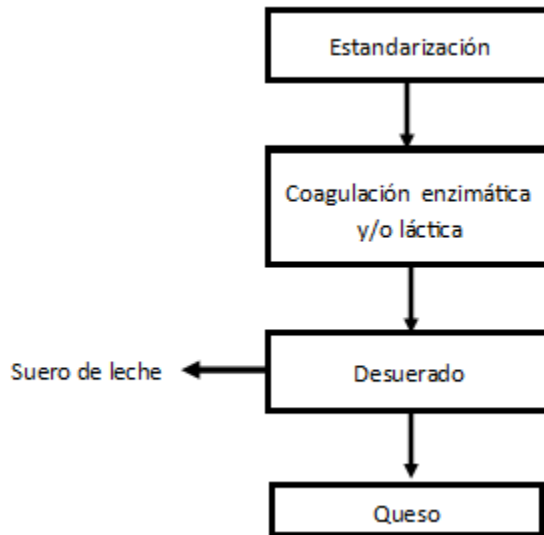


Figura 1. Elaboración de queso

Fuente: (Cervantes et al., 2008)

Estandarización

No todas las leches tienen la misma aptitud para ser transformadas en queso, debido a que representan características diferentes, como la composición de caseínas, los equilibrios salinos, el contenido en lactosa, contenido proteico, etc. Con el fin de mejorar la aptitud para la coagulación, que tiene un efecto en la calidad y rendimiento del queso, la industria quesera regula la tasa de proteína entre 35-40 g/L. Es necesario también estandarizar el contenido de grasa y calcio, los niveles varían dependiendo del tipo de queso que se desee obtener (Mahaut, M.; Jeantete, R.; Brulé, 2003).

Coagulación

Es la etapa fundamental en la elaboración del queso y resulta en la formación de un gel como consecuencia de cambios fisicoquímicos que tienen lugar en las micelas de caseínas (Sbodio & G., 2012). En esta etapa ocurre la retención de caseínas de la leche en forma de matriz proteica ligada por iones calcio (Ramírez-Nolla & Vélez-Ruiz, 2012). Se utilizan agentes para provocar la desestabilización de las micelas de caseína y la formación del coagulo, de lo cual depende el tipo de suero obtenido, los ácidos (coagulación ácida) y ciertas enzimas proteolíticas (coagulación enzimática) (García, 2004).

1.1.2.1 Suero dulce

a. Coágulo obtenido por vía enzimática

Durante la coagulación, la k-caseína es "cortada" en el enlace Phe105- Met106, por la acción de la enzima (generalmente la enzima quimosina), formando una porción hidrofóbica (para k-caseína) y una hidrofílica (caseinmacropéptido). Es entonces cuando se produce la reducción de la carga negativa neta y de la repulsión estérica y las micelas modificadas comienzan a ser susceptibles para agregarse (Lucey, 2002). Entre las fuerzas atractivas durante la agregación predominan los puentes-Ca, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas y puentes hidrógeno (Sbodio et al., 2012). La capa de agua que rodea a las caseínas y a los agregados micelares formados dificulta su asociación y el establecimiento de enlaces secundarios intermoleculares, por esto el lactosuero que se encuentra dentro del retículo tridimensional formado, va hacia el exterior produciéndose así el fenómeno llamado "sinéresis". A pesar de las fuerzas de contracción que se producen dentro del gel, la expulsión del lactosuero es débil y lenta, dado que atraviesa la masa del gel con dificultad puesto que este aún se encuentra muy mineralizado y poco permeable. El fenómeno de sinéresis se ve influenciado por la acidez. Cuanto más bajo sea el pH mayor será la retracción del coágulo y el desuere (Chamorro, 2012).

1.1.2.2 Suero ácido

b. Coágulo obtenido por vía ácida.

En este caso, la estructura micelar se destruye y el coágulo estará formado por pequeñas partículas de caseína dispersadas y desmineralizadas. No se produce el fenómeno de sinéresis (salida del lactosuero alojado en el interior del retículo) pues, en ausencia del calcio micelar en el coágulo sólo se forman enlaces débiles incapaces de asegurar la contracción del coágulo (puentes de hidrógeno sobre todo). Al no existir proteólisis enzimática tampoco existe la posibilidad de formación de nuevos enlaces. El desuerado en este tipo de coágulo se puede considerar como un simple escurrido a través de una masa porosa. Al ser las agrupaciones de caseína ahora más pequeñas retiene un mayor porcentaje de agua ligada que es difícil de separar por lo que el coágulo desuerado quedará muy húmedo y será más permeable (Chamorro, 2012).

Desuerado

El comienzo de esta etapa tiene lugar con la aparición del lactosuero. La separación de este componente comienza durante la coagulación y, tiene lugar a lo largo de varias etapas de la elaboración del queso, llegando hasta la maduración en el caso de los quesos que la sufren.

Los mecanismos fundamentales del desuerado dependen de que el coágulo se obtenga por vía láctica, enzimática o mixta (Chamorro, 2012). El lactosuero es un sustrato de gran interés debido a la presencia de lactosa y por su contenido en proteínas solubles ricas en aminoácidos indispensables, así como la existencia de vitaminas del grupo B y ácido ascórbico (Solís, 2011).

1.1.3 Composición

En la composición nutricional del suero de leche puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso (Poveda, 2013). El suero contiene aproximadamente el 55% de los nutrientes totales de la leche como sales, lactosa, proteínas solubles en agua (Casal et al., 2006), vitaminas y los residuos de grasa que no se incorporaron al queso. Ambos sueros presentan diferencias en su composición; en general, el dulce tiene un pH más elevado, mayor contenido de sólidos totales, proteínas, lactosa, lípidos y menor cantidad de calcio y fósforo (Montoya et al., 2014).

A continuación, se muestra una tabla 1 con la composición del suero y productos del suero.

Tabla 1. Composición del suero de leche

Tipo	Proteína (g/L)	Lactosa (g/L)	Grasa (%)	Minerales (g/L)	Humedad (%)
Suero dulce	6-10	46-52	0.10	2.5-4.7	93.6
Suero ácido	6-8	44-46	0.10	4.3-7.2	93.5
	g/100 g de polvo				
Concentrado de proteína (WPC)	65-80	4-21	---	3-5	4
Proteína aislada (WPI)	90-92	<1	---	2-3	4
Suero reducido en lactosa	18-24	< 58	1-4	11-22	4
Suero desmineralizado	11-15	70-80	0.5-1.8	1-7	4

(COFOCALEC, 2012; Hernández, 2014; Onwulata & Huth, 2008)

1.1.4 Producción de suero de leche

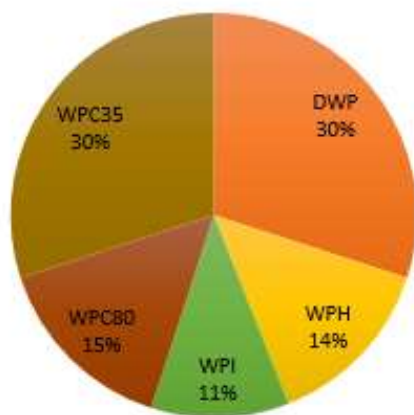


Figura 2. El mercado del suero lácteo

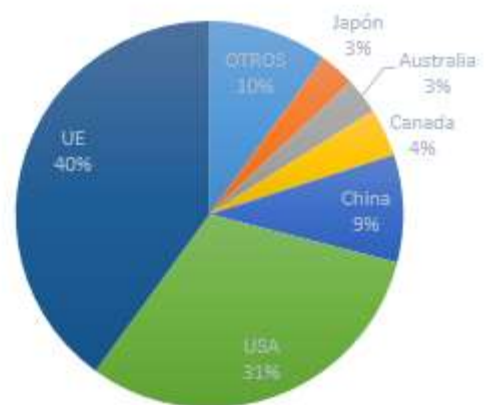


Figura 3. Países productores de suero lácteo

La producción global de suero de leche en 2014 se calcula en 240 millones de toneladas, y en 2015 se esperaba un crecimiento anual de 3.5%. El mercado global de suero tuvo un valor de \$5.4 billones en ese mismo año y se espera que alcance un valor de 8.4 billones de dólares para 2020 (Smith, 2015).

Según datos de la FAO en el 2003, la producción de suero en México ha pasado de 249 mil toneladas en 1961 a 709 mil toneladas en el 2000 (FAOSTAT, 2003), casi la totalidad de este subproducto de la industria láctea se emplea para la alimentación animal. Aproximadamente 90 por ciento del total de la leche utilizada por la industria quesera es eliminada en forma de lactosuero (Jornada, 2014).

El mercado del suero lácteo se conforma principalmente por el concentrado de proteína de suero al 35% (WPC35) y la proteína de suero en polvo (DWP), seguido del concentrado de proteína de suero al 80% (WPC80), y en menor proporción la proteína aislada (WPI) y la proteína hidrolizada (WPH). Los mayores productores de suero, la Unión Europea y Estados Unidos, son también los mercados principales para los productos de suero seguidos por China y Canadá. El 10 por ciento englobado en otros, los países asiáticos representan un mercado importante. México, algunos países sudamericanos, así como Rusia son claramente mercados emergentes. El comercio de suero ha crecido de aprox. 860.000 toneladas métricas en 2005 a más de 1.010.000 TM en 2008, lo que corresponde a un crecimiento anual del 5-6% Estados Unidos y la UE representan aprox. el 80% del comercio global. Los grandes exportadores de Occidente a Oriente son China, México y Rusia. En el Este, Japón, Corea, Tailandia e Indonesia son importantes importadores de suero (ADPI/ABI, 2009).

1.1.5 Contaminación del agua por suero de leche

En 2006, el Centro Mexicano de Derecho Ambiental, listó entre las principales causas de contaminación hídrica en México, a la contaminación industrial, por su parte la industria alimentaria, en general, no figura como una de las principales causas de contaminación del agua, sin embargo una planta alimenticia requiere un abastecimiento anual de 214 millones de metros cúbicos, y por el número de empresas que existen, su importancia económica y mayor contribución a la contaminación de aguas, los grupos contaminantes en este sector que predomina en México son las industrias de productos lácteos y la de conservas alimenticias (Flores, 2012).

Aproximadamente 1 kg de queso genera 9 kg de suero de leche. De acuerdo con la FAO, el suero, residuo líquido de la fabricación de queso y caseína, es una de las mayores reservas de proteínas alimentarias que quedan todavía fuera de los canales

del consumo humano (Schaller, 2012). Su alto contenido en lactosa significa una gran preocupación para el medio ambiente debido a los altos índices de BOD (por sus siglas en inglés, Demanda Biológica de Oxígeno), la cual expresa el peso de oxígeno necesario para la destrucción, por oxidación bacteriana, de las materias orgánicas contenidas en un líquido, esta noción permite apreciar el grado de contaminación de las aguas empleadas, la DBO de las aguas de lavado pasa raramente más de 2-3,000 ppm. El alto potencial contaminante y el alto costo de tratamiento crea dificultades a la industria láctea, por esto el suero es visto usualmente como un problema ambiental. (Das et al., 2016; Veisseyre, 1972).

A nivel mundial aproximadamente el 45% de la producción total de suero se desecha (Adolfo & Huertas, 2009), una parte significativa es dispersada en los campos de cultivo generando olores desagradables y niveles de sal que resultan problemáticos (Tavares & Malcata, 2016) y otra parte se vierte en un curso lagos, ríos y otros centros de aguas residuales, lo que afecta la flora y la fauna del curso de agua en cuestión. En efecto, al cabo de algún tiempo, aparecen algas filamentosas parduzcas o grisáceas, formando una capa de barro sobre el lecho del curso del agua. Los peces mueren rápidamente. Estos fenómenos son consecuencia de la fermentación de las materias orgánicas acarreadas por el líquido contaminado en el seno del agua. Las fermentaciones que son primero aeróbicas y después que se ha consumido todo el oxígeno disuelto, anaeróbicas, dan lugar a productos de degradación que favorecen el desarrollo de una flora característica. Por otra parte, cuando el contenido del agua en oxígeno disuelto queda por debajo de cierto umbral, los peces mueren por asfixia. Así en un río no contaminado y a la temperatura de 15°C, tiene contenido medio del agua en oxígeno de aproximadamente 10 mg por litro. En cuanto este contenido disminuye por debajo de 4 mg, los peces más exigentes en oxígeno desaparecen (Veisseyre, 1972). El vertido de un litro de suero de leche contamina 10 toneladas de agua y causaría la muerte a todos los peces contenidos en estas aguas (Uribe et al., 2008). Sin embargo, el sistema de tratamiento que se debe emplear para estas aguas residuales, por el contenido de materia orgánica, es más complicado que para un sistema de tratamiento de agua convencional, por lo que la recuperación y comercialización de sus componentes es más práctico que diseñar un sistema de tratamiento de agua, cuyo costo sería mayor (Solís, 2011).

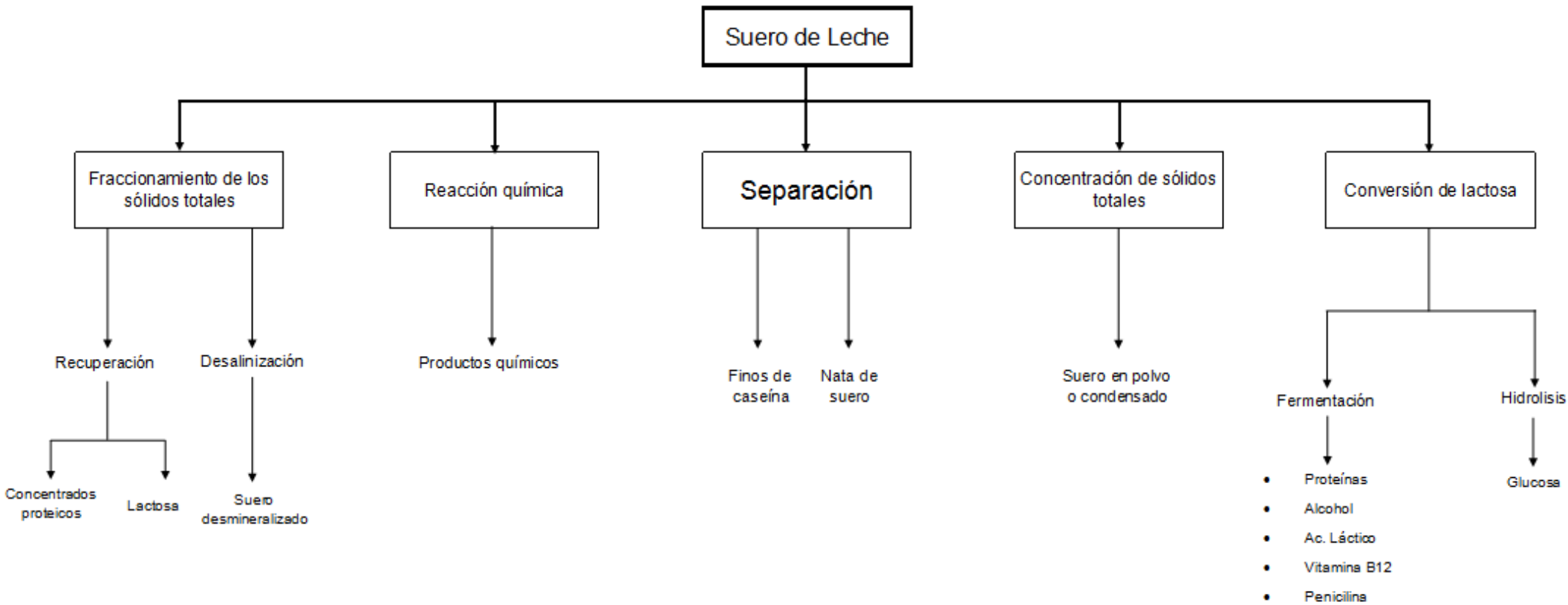


Figura 4. Aplicaciones del suero de leche.

Fuente:(Ramos et al., 2016)

1.1.6 Aplicaciones del suero de leche

El lactosuero de una quesería contiene de un 6-7% de sustancias sólidas, las cuales representan, aproximadamente, un 55% de las que originalmente contiene la leche. Por este motivo resulta interesante su aprovechamiento. De esta manera, deben habilitarse sistemas de recogida eficientes en las operaciones donde se produce el lactosuero. El lactosuero es un subproducto inestable, que precisa de ser enfriado si no se procesa al poco tiempo de su obtención. Puede emplearse para extraer numerosos productos como queda representado en la figura 4.

1.1.6.1 Suero en polvo

El suero de leche en polvo es producido a partir del suero dulce de la fabricación de quesos, el cual se somete a un proceso de pasteurización, evaporación, cristalización y secado por atomización, permitiendo con ello extraer parcialmente el agua y a la vez mantener todos los otros constituyentes en la misma proporción relativa contenida en el suero de leche. El suero en polvo es un producto muy empleado en México en diversas industrias, este polvo puede adquirir en las siguientes presentaciones comerciales:

1. Grado alimenticio. Producto indicado para ser usado de forma directa en cualquier alimento de uso humano.
2. Grado industrial. Producto indicado para ser usado en mezclas industriales que son sometidas a un posterior tratamiento térmico y/ alimentación animal (Teniza, 2008).

1.1.6.2 Desmineralización

El método de electrodiálisis descrito por Ahlgren, 1971, consiste en la remoción de minerales a través de membranas semipermeables con platos cargados positiva y negativamente. La desmineralización es llevada a cabo al nivel requerido dependiendo de la variedad de los productos deseados (desde 25-90% de sales removidas). El suero desmineralizado en polvo es utilizado comúnmente en formulas infantiles, fortificación de bebidas y en productos de panificación.

1.1.6.1 Alimentación animal

El suero que no se utiliza para los seres humanos sirve como alimentación de ganado lo cual no es algo nuevo, y ha sido utilizado en Europa y otras partes del mundo. Se ha explorado el uso de este suero como una ración importante y el remplazo del agua para las vacas (Green, J y Kramer, 1979; Onwulata & Huth, 2008). En general, cuando se experimentó con vacas lactantes, sometidas a una dieta libre de granos donde en promedio consumían 135 kg de suero y 11 kg de heno, continuaron produciendo cantidades normales de leche. También se ha utilizado el suero como suplemento para la alimentación porcina. Lundstedt, alimentaba a los cerdos de tamaño medio con una mezcla de suero (21.4kg/día), cebada (0.45kg/día) y heno (0.23kg/día) y estos aumentaban de peso constantemente (Lundstedt, 1971; Onwulata & Huth, 2008).

1.1.6.2 Recuperación de lactosa

La lactosa cruda puede ser removida del suero de leche concentrado por cristalización y centrifugación. El calentamiento del suero concentrado seguido de un enfriamiento lento con agitación constante provoca que las moléculas de lactosa se cristalicen en el suero (Green, J y Kramer, 1979).

1.1.6.3 Producción de alcohol

En la fermentación se emplea *Kluyveromyces marxianus* o *fragilis* y lactosuero desproteínizado como sustrato, con temperaturas entre 24-34°C. Este proceso tiene un rendimiento de entre 75-85% del valor teórico, por cada kilogramo de lactosa metabolizada se obtienen 0.538 kg de etanol. La producción de bebidas alcohólicas por conversión de lactosuero, está en operación en Irlanda, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Adolfo & Huertas, 2009).

1.1.6.4 Producción de ácido láctico

Se ha probado al lactosuero como buen sustrato en la fermentación para obtener ácido láctico, además el uso de este sustrato disminuye los costos operacionales en más del 50%, comparado con el uso de sustratos puros (Plata et al. 2013).

1.1.6.5 Producción de biofertilizantes

Estos abonos además de nutrir eficientemente los cultivos se convierten en un restaurador de la flora microbiana del ecosistema del cultivo, además el ácido láctico presente ayuda a eliminar bacterias patógenas. Este biofertilizante puede sustituir a los abonos químicos (Valencia & Ramírez, 2010).

Como el suero contiene niveles altos de nitrógeno, fósforo y minerales, su riego debe ser manejado con precaución, cuando se aplica inapropiadamente, puede matar a la vegetación y producir un hedor. Por otro lado, en áreas donde la precipitación anual es adecuada, con abundante vegetación para absorber el fósforo y nitrógeno, y donde las parcelas de riego están lejos de las zonas pobladas, la aplicación del suero es posible (Green, J y Kramer, 1979).

Un estudio publicado en 1970 revela que al rociar el suero en el suelo a una profundidad de 25mm, mejoran el rendimiento de maíz y heno sin incrementar la contaminación de aguas subterráneas (Onwulata & Huth, 2008).

1.1.6.6 Películas comestibles

Para la conservación de frutos usualmente se utiliza un método que incluye películas comestibles las películas comestibles se definen como una capa delgada de polímero que puede ser consumida y empleada en la superficie de un alimento con objeto de alargar la vida útil de los alimentos actuando como barrera selectiva contra los gases y la humedad. Las películas elaboradas con proteínas presentan buenas propiedades mecánicas y de barrera, debido a que las proteínas tienen una estructura única que les confiere un amplio espectro de propiedades, que están influenciadas por su estructura heterogénea, sensibilidad térmica y características hidrofílicas (García-Betanzos, Hernández-Sánchez, Bernal-Couoh et al., 2017; Valencia, E. y M., 2017). Las interacciones poliméricas que se presentan en la proteína generan películas con una red proteica rígida, menos flexible y menos permeable a los gases y vapores que otras películas. Las proteínas del suero de leche están formadas por diferentes proteínas individuales globulares y termolábiles, constituidas principalmente por β -lactoglobulina, las películas comestibles a las que dan origen se caracterizan por presentar buenas propiedades de barrera al oxígeno, lípidos y a los aromas. El lactosuero se usa para producir por vía fermentativa un ingrediente antimicrobiano

utilizado en la elaboración de empaques comestibles. De esta forma se obtienen películas biodegradables con actividad antibacteriana. Montalvo, López y Palou reportan la aplicación de estas películas comestibles a frutos como manzana, fresa, jitomate y kiwi, con resultados satisfactorios. Mientras que Albizú, concluyó que el recubrimiento comestible a base de proteína de suero de leche no tuvo efecto en las características sensoriales de apariencia, aroma, textura, sabor, acidez y aceptación general del queso Cheddar (Albizú & Ac, 2011; Montalvo, López y Palou, 2012).

1.1.6.1 Bebidas

Se reporta el uso de suero en bebidas y postres. El suero ha sido consumido como una bebida desde tiempos antiguos, usualmente utilizados para propósitos médicos (Zall, 1967). Se describe una bebida donde el suero es la base de ésta, combinada con frutas o algunos jugos de vegetales para obtener nutritivas combinaciones, así como una bebida carbonatada sabor chocolate con contenido proteico (González, 2017; Holsinger, V.H. y Posati, 1967).

1.2 Proteínas lácteas

Las proteínas son las moléculas orgánicas que constituyen más del 50% del peso seco de la célula. Existen diferentes clases de proteínas fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celular, ya que llevan a cabo todo tipo de funciones: estructura, transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas (Nelson & Cox, 2008).

En los sistemas alimenticios la importancia de las proteínas no es menor. Poseen propiedades nutricionales, además de sus componentes se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de quien las consume, pueden ser ingredientes de productos alimenticios y, debido a las propiedades funcionales, ayudan a establecer estructura y propiedades finales de los alimentos. Las proteínas alimentarias se pueden definir como las proteínas que son fácilmente digeribles, no tóxicas, nutricionalmente adecuadas, útiles en los alimentos

y disponibles en abundancia. Las proteínas contenidas en la carne, leche y huevo se consideran indispensables en la dieta de los niños (Badui Dergal, 2006).

1.2.1 Evaluación

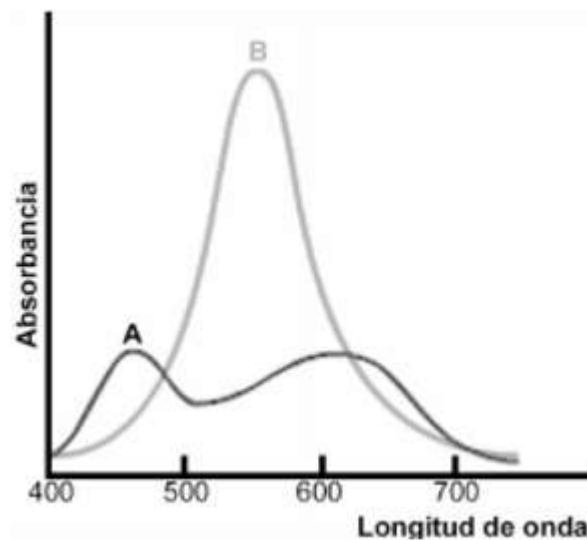
Existen diversos métodos para la cuantificación de las proteínas, todos ellos basados en alguna de sus propiedades típicas, como puede ser la absorbancia de los grupos aromáticos a 280 nm, la reactividad del enlace peptídico o el contenido de nitrógeno total (Badui Dergal, 2006).

De acuerdo con García-Arellano & Vázquez-Duhalt, 1998, el uso del método adecuado depende de cinco criterios:

1. Cantidad presente de proteína en la muestra
2. Concentración de la proteína
3. Especificidad del método
4. Presencia de sustancias que interfieran con la lectura
5. Facilidad y reproductibilidad del método.

1.2.1.1 Método de Bradford

El método está basado en la observación de que el colorante azul Brillante de Coomasie G-250 presenta dos formas coloreadas, azul y rojo. El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465-595 nm y se monitorea midiendo el incremento en la absorción a 595nm (fig 5). El ensayo es reproducible y rápido, puede ser empleado para procesar un gran número de muestras. La formación del complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora, por lo que el procedimiento es muy rápido y el tiempo para el ensayo no es limitante (García-Arellano & Vázquez-Duhalt, 1998; Roca, Oliver, & Rodríguez, 2003).



A. Azul Coomassie. B. Complejo proteína-colorante.

Figura 5. Espectro de absorción del complejo proteína-azul Coomassie G-250.

1.2.1.2 Método Kjeldahl

Desarrollado por Johan Kjeldahl, investigador de una fábrica de cerveza en Dinamarca, se trata de un método muy exacto, aunque un método lento, el cual hace la medición indirectamente del contenido total de proteína a partir de la cuantificación de nitrógeno, si se conoce la proporción de nitrógeno en la proteína que, por término medio, se sitúa en un 16%. Consiste básicamente en 3 pasos principales: digestión, destilación y titulación.

- Digestión. La fracción de carbono de la muestra es oxidada y convertida en dióxido de carbono y agua con la ayuda de ácido sulfúrico concentrado, catalizador y calor, a su vez el nitrógeno presente en el ión amonio (NH_4^+) se transforma a sulfato de amonio durante esta digestión (ec. 1). El catalizador empleado mejora la digestión, y se componen de Hg, Se, Cu o Ti en combinación con sulfato de sodio o potasio (fig 6).

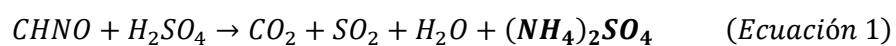
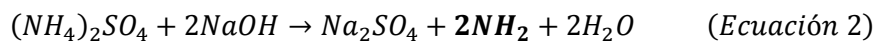


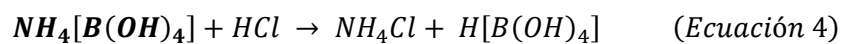


Figura 6. Digestión para micro Kjeldahl

- Destilación. La solución digerida es después destilada con exceso de hidróxido de sodio, el ión amonio se evapora en forma de amoniaco con la adición de NaOH, el cual debe ser añadido cuando el tubo con la digesta esté completamente frío, pues se trata de una reacción exotérmica (ec.2), el vapor es recogido por destilación contra corriente en un frasco receptor que contienen ácido bórico. El ácido bórico forma un complejo con el amoniaco (ec. 3) que se titula directamente con ácido valorado.



- Titulación. El amoniaco se libera del complejo amoniaco-borato con el uso de un ácido fuerte empleando para titular (HCl), utilizando como indicador rojo de metilo, esta adición nos lleva a la formación de cloruro de amonio y ácido bórico (ec. 4). A partir del número de equivalentes de HCl utilizados, se puede conocer la cantidad de nitrógeno presente, y multiplicando por el factor adecuado, la cantidad de proteína presente.



El método original ha sufrido diversas modificaciones y mejoras. En su forma más utilizada las muestras son digeridas con ácido sulfúrico, sulfato de potasio en presencia de un catalizador, además este método posee una gran precisión y su uso se extiende en el estudio de las proteínas contenidas en alimentos (Hérendez, 2011; Roca et al., 2003; Wang, et al., 2016).

1.2.1.3 Análisis electroforético

La electroforesis es una técnica que ayuda en el estudio del movimiento de las biomoléculas con una carga neta a través de un campo eléctrico. Las técnicas electroforéticas tienen como fuerza impulsora la generada por el campo eléctrico y como fuerza retardante la que puede ejercer el medio contra el movimiento. De esta manera, las técnicas electroforéticas se fundamentan en una velocidad de migración diferencial de las biomoléculas cuando son sometidas a un campo eléctrico, esta migración depende de la forma, tamaño, carga y composición química. Las moléculas con carga positiva migran al cátodo (electrodo con carga negativa) y las moléculas con carga negativa migran al ánodo (electrodo con carga positiva). La velocidad de esta migración se encuentra influenciada por las características de la biomolécula que migra, la intensidad del campo eléctrico y las características del medio en la que tiene lugar la migración.

Existen diversos tipos de electroforesis, por ejemplo, para moléculas de bajo peso molecular como lo son los aminoácidos y carbohidratos, se utilizan los geles de celulosa mientras que los geles de poliacrilamida y agarosa se utilizan para moléculas de mayor peso molecular, como ADN y proteínas.

La realización de una separación electroforética requiere dos dispositivos: uno que genera el campo eléctrico (fuente electroforética) y otra que contiene el soporte con las muestras, donde se realiza la separación. Esta técnica se utiliza para analizar y determinar el peso molecular de diferentes tipos de biomoléculas, pero es más común utilizarlas para proteínas y ácidos nucleicos (Roca et al., 2003; Segal, C.; Ortega, 2005).

1.2.2 Clasificación

El nitrógeno contenido en la leche es distribuido entre las caseínas, las proteínas de suero y la materia nitrogenada no proteica (MNNP), la distribución de la materia nitrogenada en promedio es cerca de 76% de caseínas, 18% proteínas de suero y 6% MNNP, usualmente se utiliza esta clasificación en trabajos de investigación y como punto de control de proceso (Villegas, 2004; Y.H.Hui, 1993). Las proteínas de la leche se pueden clasificar de acuerdo a la fig. 7.

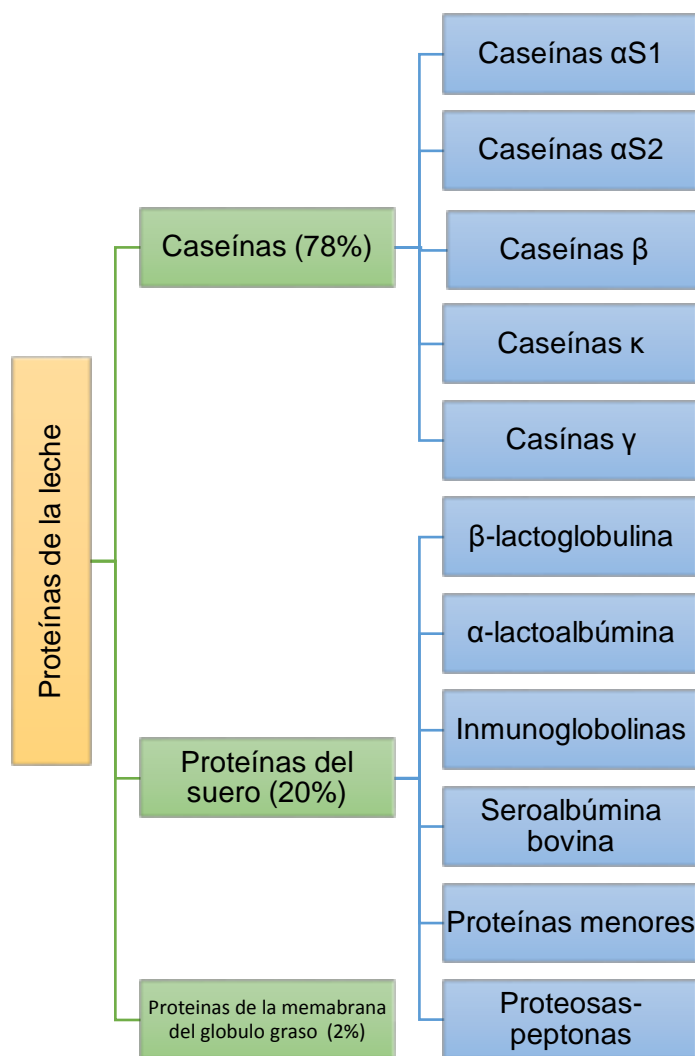


Figura 7. Clasificación de las proteínas lácteas.

Fuente:(Villegas, 2004)

1.2.2.1 Caseínas

Se encuentran aproximadamente 26 g de caseínas por cada kg de leche, son grandes moléculas proteicas conformadas por un grupo fosfato y un gran número de aminoácidos, entre los cuales predominan el ácido glutámico, la leucina y la prolina. Los fosfatos están ligados a la serina y a la treonina.

La κ -caseína es proteolizada por la renina del cuajo al nivel de los aminoácidos 105 (fenilalanina) y 106 (metionina), lo cual desencadena la coagulación de la leche por esto representa un papel fundamental en la tecnología quesera. Las caseínas no

forman agregados con las proteínas de suero excepto durante un tratamiento con calor: cuando la leche se sobrepasteuriza, la β -lactoglobulina reacciona con la κ -caseína y forman un complejo estable, por medio de puentes disulfuro, esto empeora las condiciones de cuajado enzimático de la leche para quesería (fig. 8) (Villegas, 2004; Y.H.Hui, 1993).

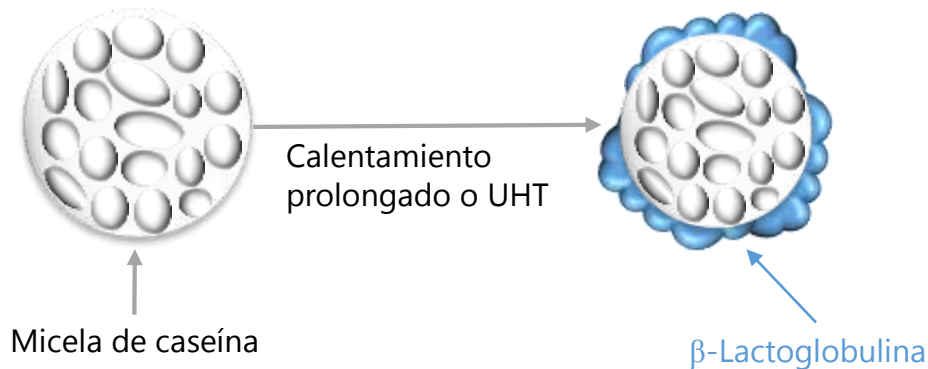


Figura 8. Complejo β -lactoglobulina- κ -caseína

Fuente: (Garza, 2014)

1.2.2.2 Proteínas del suero

Las proteínas del suero de la leche son un conjunto de proteínas globulares que permanecen solubles en el lactosuero, ya sea que la leche sea cuajada por acidificación a pH 4.7 o por vía enzimática, aunque pueden ser separadas físicamente del suero lácteo. Por otro lado el calentamiento del suero por encima de los 70°C las desnaturaliza y provoca su floculación (Villegas, 2004).

Las principales proteínas del suero (β -lacto globulina y α -lacto albumina), que constituyen entre el 50 y 20% de las proteínas totales, respectivamente, tienen la capacidad de solubilizarse en agua en su forma original. El resto es representado por proteínas en menor proporción, entre las que se encuentran las inmunoglobulinas, proteasas-peptonas, albumina sérica bovina y lactoferrina, lactoperoxidasa (Ramos et al., 2012). El suero además contiene cantidades importantes de aminoácidos principales, sulfurados y aminoácidos de cadena ramificada (Boland & Zealand, 2011; Hernández, 2012; Kilara & Vaghela, 2002).

Las proteínas del suero de leche pueden ser de síntesis mamaria tal es el caso de la β -lacto globulina y α -lacto albumina y la lactoferrina o pueden ser de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas (Hernández, 2012).

Las características únicas de las proteínas del suero de leche son su solubilidad en un rango amplio de pH, un perfil nutricional favorable con respecto a los aminoácidos esenciales, propiedades funcionales y un costo relativamente bajo (Kilara & Vaghela, 2002).

Tabla 2. Proteínas del suero de leche			
Proteína	Contenido (%)	Peso molecular (Da)	Punto isoeléctrico
β -lactoglobulina	48	18,400-36,900	5.35-5.49
α -lactoalbumina	19	14,200	4.2-4.5
Proteosa-Peptona	20	4,000-80,000	5.1-6
Albumina sérica	6	69,000	4.8
Inmunoglobulina	8	160,000	5.5-8.3
Lactoferrina	0.01	80,000	8-8.5

(Alais, 2003; Kilara & Vaghela, 2002; Santos, Teixeira, & Rodrigues, 2012)

β -lactoglobulina

La proteína más importante en los concentrados proteicos es la β -lacto globulina, constituye aproximadamente 12% de la proteína total contenida en la leche de vaca (Boland & Zealand, 2011), es una proteína globular de la familia lipocalinas cuya desnaturalización ocurre a los 76°C, es importante tener en cuenta cómo afecta el calor a esta proteína, ya que al ser la más abundante en el suero, tienen a dominar el comportamiento térmico del sistema de proteínas del suero de leche (Kilara & Vaghela, 2002; Onwulata & Huth, 2008).

Funciona como agente emulsionante y contiene 22 Leucinas, 10 Isoleucinas, y 9 Valinas, haciéndola una de las proteínas conocidas más ricas en estos aminoácidos, y dándole regiones hidrofóbicas muy fuertes, además contiene también residuos azufrados que le permiten formar puentes disulfuro intramoleculares o intermoleculares, importantes para su estabilización (Boland & Zealand, 2011; Poveda E., 2013; Villegas, 2004). Además β -lacto globulina es rica en cisteína, un aminoácido esencial que estimula la síntesis de glutatión, un tripéptido no proteico producido por el hígado para protección contra tumores (de Wit, 1998).

El centro de esta proteína es hidrofóbico, por lo que es capaz de fijar moléculas hidrófobas, como colesterol y retinol (González, 2017). Aunque la función de la β -LG no es del todo comprendida, se menciona que debido a su afinidad con el retinol, su función biológica puede ser relacionada con el transporte de la vitamina A (Onwulata & Huth, 2008).

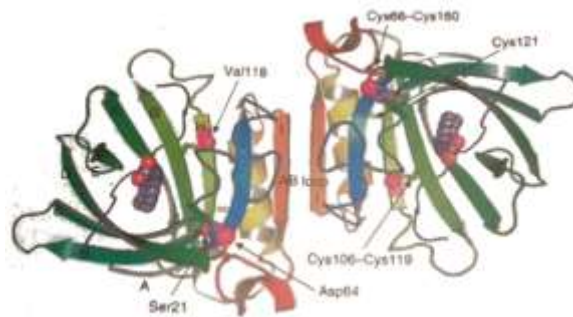


Figura 9. Diagrama de la estructura dímica de β -lactoglobulina mirando hacia abajo del doble eje

(Thompson, Boland, & Singh, 2009)

α -lactoalbumina

La segunda proteína más abundante en el suero es la α -lacto albumina que comprende cerca del 20% del total de la proteína de leche. La molécula consiste en 123 aminoácidos (figura 10) (Kilara & Vaghela, 2002). Su estructura está bien definida con puentes disulfuro, lo que significa que por ella misma se puede desenvolver cuando es sometida calor, y envolverse a algo parecido a su forma nativa (Boland & Zealand, 2011). Tiene una particular afinidad con el calcio la cual decrece cuando el pH está cerca de su punto isoeléctrico, perdiendo totalmente su afinidad a un pH alrededor de 1.7. Cuando el calcio es removido la α -La se desdobra. La desestabilización de α -La a baja concentración de calcio parece ser reversible (Lucena, Alvarez, Men, Riera, & Alvarez, 2007). Su temperatura de desnaturalización ocurre a 67°C (Kilara & Vaghela, 2002). La función biológica principal de la α -lacto albumina es la de ayudar en la biosíntesis de lactosa (de Wit, 1998).



Figura 10. Estructura de α -lactoalbumina

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1F6S&chainnumber=1>

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas comprenden al menos el 2% de las proteínas totales de la leche. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas encontradas en la leche IgG1, IgG2, IgA y IgM, todas estas moléculas tienen una estructura base similar (Kilara & Vaghela, 2002), son proteínas globulares, lábiles al calor y está conformada por dos cadenas grandes y dos cadenas ligeras, cada una está unida por puentes disulfuro (Boland & Zealand, 2011).

Proteasa-Peptona

La fracción de proteasa-peptonas contenidas en el suero no está asociado con la caseína, contiene alrededor de 17% de carbohidratos y tiene un peso molecular aproximado de 20,000. El anticuerpo para proteger el componente de peptona reaccionará en forma cruzada con la membrana de glóbulos grasos y se ha sugerido que este componente se origina en la membrana (Kilara & Vaghela, 2002).

Albúmina sérica

La seroalbumina de la leche y de la sangre son estructural e inmunológicamente idénticas. Se considera como un componente menor en el suero, con peso molecular alto. La cadena péptica, libre de fosforo, compuesta por 582 aminoácidos y en la posición 34 tiene cisteína con un grupo -SH libre, además contiene 17 disulfuros que estabilizan la estructura de esta proteína sérica globular. Es capaz de reaccionar con

la β -lacto globulina debido al gran número de puentes disulfuro que posee, además tiene sitios de unión específicos para moléculas hidrofóbicas (Boland & Zealand, 2011; Kilara & Vaghela, 2002; Schilimme & Wolfgang, 2005).

Lactoferrina

El lactosuero contiene proteínas que fijan específicamente el cobre y el hierro, con una gran estabilidad, el enlace metal-proteína es también reversible. La lactoferrina bovina es una glicoproteína monomérica, globular comprendida por 680 aminoácidos aproximadamente y una masa molecular de 80kDa. Pertenece la familia de las proteínas transportadoras de hierro, también denominadas como transferrinas, su punto isoeléctrico entre 8 y 8.5. Se le han atribuido diversas funciones como bacteriostática, bactericida, anticancerígena y acarreadora de minerales esenciales, principalmente hierro (Alais, 2003; Milke & González, 2016; Thompson et al., 2009).

1.2.3 Recuperación

Por lo general, los productos de proteína de suero están disponibles en tres formas: concentrados (WPC), aislados (WPI) e hidrolizados (WPH) (Santos et al., 2012). Para que un proceso comercial sea factible se debe recuperar al menos 50% de la proteína cruda. Recuperación máxima de la proteína se obtiene al desnaturalizar la proteína en un rango de pH de 6-7 y temperaturas mayores a 90°C por 10-30 min, seguido de la precipitación a pH entre 4.4-5. La recuperación de las proteínas mejora con una desmineralización anterior a la precipitación (Hill, Irvine, & Bullock, 1982).

Así mismo para la obtención de concentrados proteicos y lactosa de excelente calidad y valor agregado, es importante la eliminación de grasa del suero. Esta eliminación es considerada esencial porque las grasas constituyen uno de los agentes de saturación que pueden contribuir a la alteración de sabores en los productos almacenados (Souza, Gimenes, & Costa, 2008). Los pre tratamientos que utilizan cloruro y calor seguido de una clarificación por centrifuga, resulta en un concentrado de proteína con menor contenido total de lípidos, sin embargo la remoción de lípidos con adición de más calcio también resulta en una mayor pérdida de proteínas (Kilara & Vaghela, 2002).

Las funciones proteicas se han relacionado con su estructura nativa, que dependen del pH, la temperatura, la presión y los efectos del disolvente. Los cambios en la

estructura nativa afectan las propiedades funcionales, por lo que es de gran interés el desarrollo de procesos eficaces de separación y purificación que eviten la desnaturalización y la pérdida de actividad biológica (Santos et al., 2012).

1.2.3.1 Tratamientos térmicos

La precipitación de las proteínas del suero por la desnaturalización por calor es relativamente directa y es una de las técnicas más usada para la recuperación de la mayoría de estas (Townend, 1978). El proceso de concentración se realiza por medio de evaporadores de película descendente, de este proceso se obtiene un producto de 45-65% de sólidos que se enfría a 15-20°C para obtener la lactosa cristalizada, debido a que el suero condensado es una solución sobresaturada de lactosa. Si se requiere deshidratar completamente el concentrado se somete al secado, que se lleva a cabo por medio de atomización (Campos, 2017).

La desnaturalización de las proteínas es uno de los principales efectos de este calentamiento. La desnaturalización puede ser dividida en dos procesos: el desdoblamiento y la agregación, que generalmente le sigue a un desdoblamiento irreversible (de Wit, 1998). Dependiendo de las condiciones fisicoquímicas de la leche, la desnaturalización puede ser reversible o no. El proceso de desnaturalización es reversible, cuando el desdoblamiento parcial de las proteínas del suero tiene lugar con una pérdida de estructura helicoidal, o irreversible cuando se produce un proceso de agregación que implica el intercambio de sulfhidrilo (-SH) / disulfuro (S-S) y otras interacciones inter-moleculares, como las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Estas reacciones de desnaturalización y agregación son de gran interés porque su conocimiento es esencial para idear maneras de manipular las propiedades químicas y nutricionales de los productos lácteos (Wijayanti, Bansal, & Deeth, 2014).

En general, la agregación de proteína de suero implica la interacción de un grupo -SH libre con el enlace S-S de proteínas que contienen cisteína tales como β -Lg, κ -caseína (κ -Csn), α -La y BSA a través de reacciones de intercambio -SH / S-S. Estas interacciones proteína-proteína conducen a la agregación irreversible de proteínas en complejos de proteínas de tamaño molecular variable dependiendo de las condiciones de calentamiento y la composición de proteínas. El conocimiento de las formas de inhibir la formación de estos complejos de proteínas es necesario con el fin de minimizar las consecuencias prácticas negativas que pueden surgir (Wijayanti et al., 2014).

1.2.3.2 Membranas de intercambio iónico

El procesamiento mediante intercambio iónico es utilizado para producir la mayoría de los aislados de proteína, este método se basa en la separación por medio de la unión de la proteína a un medio de intercambio iónico y el lavado de los minerales y la lactosa, para posteriormente obtener las proteínas utilizando un cambio iónico en el medio y/o pH. Este método puede producir una proteína pura, pero se modificara la composición de dicha proteína, reteniendo únicamente las proteínas con cargas iguales, y puntos isoeléctricos parecidos (Boland & Zealand, 2011).

La industria láctea ha realizado muchos esfuerzos para desarrollar técnicas de separación eficientes que permiten la producción de nuevos productos, como la precipitación, las membranas y la cromatografía. Sin embargo, mediante la precipitación y las técnicas de membrana, la proteína del suero es propensa a la desnaturalización y estos procesos son dependientes del volumen, lo que hace que el fraccionamiento del suero sea muy caro (Santos et al., 2012).

1.2.3.3 Ultrafiltración y microfiltración

Tecnologías como ultrafiltración y microfiltración son utilizadas en la mayoría de las plantas procesadoras en Estados Unidos. La ultrafiltración otorga la oportunidad de concentrar las proteínas, brindarle valor agregado y funcionalidad, y utilizar el concentrado proteico en la formulación de diversos alimentos (Riquelme Gyimesy, 2015). Los métodos de ultrafiltración y desmineralización por electrodiálisis son los más recomendados para la remoción de proteínas y sólidos suspendidos, sin embargo la eficacia del proceso se reduce considerablemente al tiempo que la membrana se “ensucia” (Mukhopadhyay, Talukdar, Chatterjee, & Guha, 2003).

El sistema de ultrafiltración y microfiltración consiste en una corriente de alimentación que es introducida en un arreglo de módulos. El agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana y son removidos como “permeado”. Los solutos de alto peso molecular y sólidos suspendidos son retenidos por la membrana y finalmente removidos como “concentrado” (Díaz, Pereira, & Cobos, 2004). La separación por estos métodos ocurre normalmente a temperaturas debajo de 55°C, con una presión de entrada alrededor de 300 kPa y una abertura de poro de 250nm, para ultrafiltración y entre 0.005 a 10 µm en el caso de micro filtración, permitiendo

en este ultimo la separación de las diferentes proteínas de suero y otros componentes (Onwulata & Huth, 2008).

Primero el lactosuero debe ser sometido a una filtración para retirar los sólidos producto de la cuajada y producción del queso. Se procede al descremado del lactosuero por centrifugación y finalmente, el fluido está listo para entrar al proceso de ultrafiltración. De este proceso se obtiene el permeado, el cual corresponde a la fracción de proteínas, que por su tamaño, pudo traspasar la membrana; y el retentado, que es finalmente el concentrado de proteínas del suero, que por su tamaño, no lograron atravesar la membrana (Riquelme Gyimesy, 2015).

Aunque estas tecnologías pueden manejar grandes cantidades de residuo, tienen algunas limitaciones principalmente el “ensuciamiento de la membrana”, causado por la deposición y acumulación de partículas submicrónicas sobre la superficie de la membrana y/o la cristalización y precipitación de solutos sobre la superficie y dentro de los poros de la membrana. El rendimiento nunca llega a ser el mismo a pesar de la limpieza química y física y durante un período de tiempo, los módulos necesitan ser reemplazados. Además de los altos costos de operación, una preocupación en los procesos de separación de membrana es la productividad, o el rendimiento de separación por costo unitario. Las unidades de procesamiento de alimentos típicas que utilizan ultrafiltración operan a una eficiencia energética media ponderada de alrededor del 45% (Savant & Torres, 2000). Además, la ultrafiltración no es suficiente para la eliminación completa de la lactosa, ni para el aislamiento de proteínas simples puras (Santos et al., 2012).

1.2.3.4 Precipitación por formación de complejos (Interacción proteína-polisacárido)

La interacción proteína-polisacárido ocurre naturalmente en los sistemas biológicos, donde la interacción resulta en propiedades funcionales específicas. Para propósitos de separación, se distinguen dos mecanismos: coacervación compleja e incompatibilidad.

La coacervación compleja es la separación de una solución macromolecular, compuestas por al menos dos macromoléculas en dos fases líquidas inmiscibles (Cooper, Dubin, Kayitmazer, & Turksen, 2005). La coacervación compleja, incluye la separación espontánea en fases con diferentes concentraciones de solvente. La incompatibilidad se refiere a la segregación de los polímeros en fases separadas. En

una mezcla compleja, las propiedades coloidales dependen de la funcionalidad individual de la proteína y polisacáridos presentes. Las interacciones repulsivas no son específicas y duración variable. En la mezcla de las proteínas con polisacáridos no iónicos pueden ocurrir las interacciones repulsivas (Moraes Da Fonseca, 1999).

La coacervación proteína-poli-electrolito es un caso especial de la coacervación poli-electrolito-coloidal en donde la fase densa es rica en proteína y el poli-electrolito, cuando la fase diluida, contiene una mezcla en equilibrio de proteína y poli-electrolito. La coacervación es el contraste de la precipitación, que corresponde a la separación sólido-líquido (Cooper et al., 2005).

Entre las ventajas de las técnicas de precipitación para la recuperación de proteínas son que dichas proteínas estarán en su forma no desnaturalizada, son fáciles de procesar y dependiendo del proceso, hay ahorro de energía y la instalación del equipo es más sencilla (Moraes Da Fonseca, 1999).

1.2.4 Propiedades funcionales y nutricionales de proteínas suero de leche

Las proteínas de suero de leche son reconocidas por su alto valor nutricional, que son aprovechables para el ser humano, ya que permanecen solubles al pH ácido del estómago, permitiendo la absorción a través del intestino; se ha demostrado científicamente estas proteínas ejercen determinados efectos biológicos y fisiológicos, potenciando la respuesta inmune celular, reducen el riesgo de enfermedades relacionadas con el corazón, cáncer y reducen la presión arterial. Adicional a esto, son una fuente importante de aminoácidos esenciales (Alomirah & Alli, 2004; González, 2017).

Además las proteínas de suero de leche han encontrado en un lugar privilegiado como ingredientes funcionales en la industria de alimentos debido a su solubilidad en un amplio rango de pH, propiedades funcionales únicas y costos relativamente bajos en comparación con otros productos proteicos (Hernández, 2012), por lo mismo los concentrados proteicos de lactosuero son ingredientes utilizados en una gran variedad de productos de panadería, productos lácteos, carne, bebidas y fórmula para bebés (Díaz, Pereira, & Cobos, 2004).

Los componentes proteicos del suero con actividad funcional son: β -lacto globulina y α -lacto albúmina, inmunoglobulinas, albúmina de suero bovino, glicomacropéptidos, enzimas como lactoferrina, lactoperoxidasa y pequeños péptidos, como los promotores de crecimiento (Fontecha et al, 2010).

Se han llevado a cabo amplias investigaciones sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero como gelificante, espumante y emulsionante (Ikeda, 2003):

Espumante

Una propiedad importante de las proteínas asiladas de suero de leche es la capacidad de estabilizar y crear productos aireados, sin embargo la poca cantidad de grasa puede llegar a deteriorar esta capacidad (de Wit, 1998). La β -lactoglobulina muestra las mejores características de formación de espuma, con valores altos de sobre-rendimiento que la α -lacto albumina. Cuando se mezclan estas dos proteínas, el sobre-rendimiento exhibe un incremento lineal con el aumento de concentración de β -lactoglobulina (Hernández, 2012).

Emulsificante

Una fracción importante de las proteínas de suero son las proteínas globulares que a su vez funcionan como agente tenso activos (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica). Debido a la naturaleza anfifílica, estas proteínas son utilizadas como agentes emulsificantes, facilitando la formación de una emulsión, mejorando su estabilidad, y produciendo propiedades fisicoquímicas deseables en estos sistemas dispersos, principalmente en sistemas aceite en agua (de Wit, 1998; Onwulata & Huth, 2008).

Formación de geles

Las proteínas de suero de leche también poseen la habilidad de formar geles y emulsiones, lo que las hace un material ideal para la encapsulación de componentes bioactivos. El calentamiento de una solución acuosa de proteína globular induce la desnaturalización y la agregación de moléculas de proteína y un gel macroscópico pueden formarse a una concentración de proteína suficientemente alta (Ikeda, 2003; Lee & Hong, 2009).

1.3 Quitosán

Obtenido por primera vez a partir de la quitina en 1930 por Rammelberg (Wypych, 2016), el quitosán es uno de los polímeros más abundantes, el segundo más abundante en la naturaleza después de la celulosa, además es el único polímero catiónico, por lo que tiene muchas aplicaciones dado su carácter único, como floculante para recuperación de proteínas, descontaminación, etc. (Choi, Nam, & Nah, 2015; Liu & Bai, 2014; Rinaudo, 2006).

El quitosán es el principal punto de venta de los productos quitinosos, debido a su utilidad en el tratamiento de una amplia gama de sistemas de agua potable y de aguas residuales para la purificación, clarificación y concentración de sólidos, por su seguridad y eficacia en la reducción de la demanda biológica de oxígeno. Actualmente, el uso práctico de quitosán requiere el transporte y almacenamiento del componente solubilizado en ácido fórmico o acético (Austin & Sennett, 1986).

Grado de desacetilación promedio	65-95%
Peso molecular promedio	33,700-99,400 Dalton
Densidad a 20°C	1.4-1.42 g/cm ³
Temperatura de descomposición	313-317°C

(Wypych, 2016)

1.3.1 Estructura

El quitosán es un polisacárido lineal (fig. 11) compuesto de enlaces glicosídicos de tipo $\beta(1-4)$ distribuidos aleatoriamente, entre D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, el cual se obtiene de la N-desacetilación de la quitina (Rinaudo, 2006).

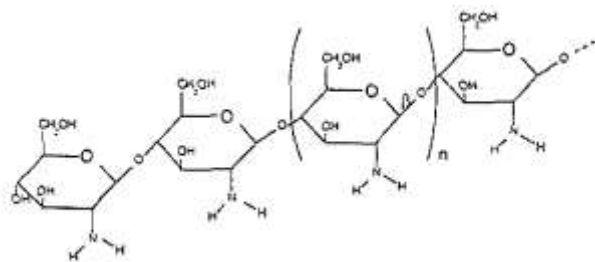


Figura 11. Estructura del quitosán

Fuente: (Jiménez, 2016)

El quitosán se puede caracterizar principalmente por su grado de desacetilación y peso molecular, los cuales afectan directamente las propiedades físicas, reológicas y la solubilidad de este compuesto (Jiménez, 2016; Miranda & Lizárraga, 2012):

- El grado de desacetilación está determinado por la proporción de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, además se relaciona directamente con la solubilidad en ácidos diluidos, viscosidad, capacidad de intercambio iónico, entre otras. (Yao, Li, Yao, & Yin, 2012) La solubilización se produce por protonación de la función $-NH_2$ en la posición C-2 de la unidad de repetición D-glucosamina, por lo que el polisacárido se convierte en un poli electrolito en medio ácido. El quitosán es el único polímero catiónico y por lo tanto, encuentra muchas aplicaciones que se derivan de su carácter único (floculantes para la recuperación de proteínas, tratamiento de aguas, etc.). Al ser soluble en soluciones acuosas, es ampliamente utilizado en diferentes aplicaciones como soluciones, geles o películas y fibras (Miranda & Lizárraga, 2012). Un mayor número de grupos amino libres en la molécula de quitosán, resultan en un alto grado de desacetilación, un mayor número de cargas positivas en solución y por lo tanto un aumento en la solubilidad, biodegradabilidad, reactividad y absorción de sustratos del quitosán (PAG 23 XOC). Existen diversos métodos para medir el grado de desacetilación como alcalimetría (titulación ácido-base), titulación electrolítica, índice de refracción, análisis térmico, cromatografía de gases, siendo los más comunes la titulación ácido-base, seguido de espectroscopia infrarroja y titulación electrolítica (Yao et al., 2012).

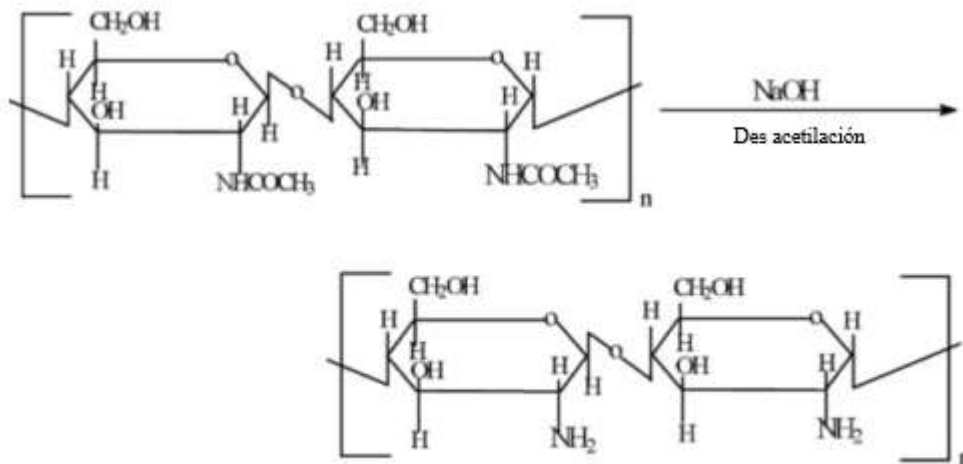


Figura 12. Desacetilación de la quitina

Fuente: (Miranda & Lizárraga, 2012)

- El peso molecular representa el tamaño promedio de las moléculas además es proporcional a su viscosidad, siendo el quitosán de bajo peso molecular aquel que oscila entre 20,000-190,000 dalton, y alto peso molecular 190,000-375,000 dalton (Wypych, 2016). Esta característica puede ser cuantificada de diversas formas como cromatografía de exclusión molecular, por medio de la medición viscosidad, osmometría de membrana., entre otras. La cromatografía de exclusión molecular se aplica para la medición del peso molecular promedio y peso molecular relativo en número medio (Yao et al., 2012).
- Contenido de nitrógeno. Tanto la quitina como el quitosán son polímeros que contienen nitrógeno. El contenido teórico de nitrógeno en la quitina con todos N-acetil, aminos acetaminos y sin cristales de agua es de 6.9%, mientras que para el quitosán 100% desacetilado es de 8.7%, el contenido de nitrógeno varía dependiendo del grado de desacetilación, como se observa en la grafico 11 El contenido de nitrógeno puede ser cuantificado por medio del método Kjeldahl, donde la muestra debe estar completamente seca hasta no contener agua o cristales de agua, y no puede contener componentes nitrogenados como nitritos o nitratos (Yao et al., 2012).

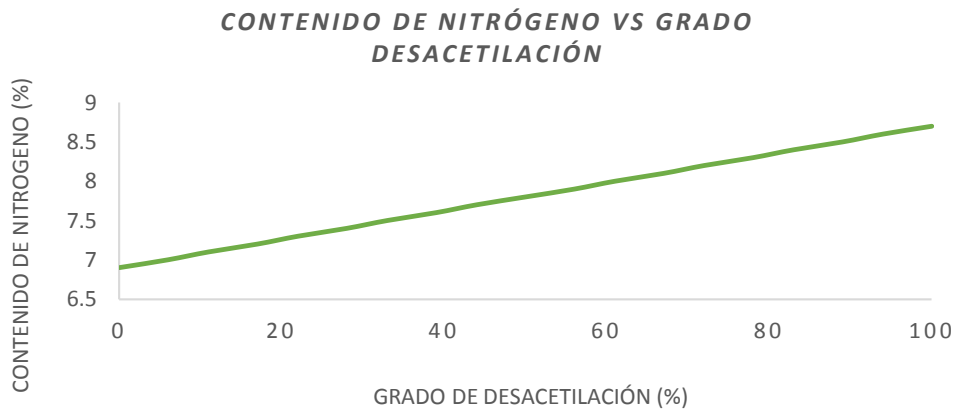


Grafico 1. Contenido de nitrógeno vs grado desacetilación

1.3.2 Extracción

La quitina es el segundo polisacárido más abundante y cada año aproximadamente más de 100 billones de toneladas de quitina son producidas a partir de especies fúngicas, insectos o del exoesqueleto de animales marinos, como langosta, camarón, cangrejo y langostinos, siendo este último el método más utilizado comercialmente. Las diferencias en los métodos de obtención del quitosán afectan considerablemente sus características (Muxika et al., 2017; Vakili et al., 2014).

Los minerales y las proteínas deben ser separados de la quitina, en la mayoría de los tratamientos de obtención se remueve el carbonato de calcio y fosfato de calcio con ácido (Jiménez, 2016). El proceso industrial más utilizado para la extracción de quitina consiste en 3 pasos principales:

a. Desproteínización de la materia prima

Las proteínas se extraen generalmente con la ayuda de soluciones alcalinas de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, también se han utilizado soluciones de Na_2CO_3 , NaHCO_3 , K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2S , CaHSO_3 y Na_3PO_4 . La temperatura, concentración del álcali y la proporción del desecho en solución son factores que afectan la efectividad de la desproteínización. Las concentraciones puede variar entre 1M - 4M a temperaturas de 25 - 100°C y tiempos desde 0.5 a 72 horas, sin embargo, las altas concentraciones de álcali y altas temperaturas de reacción, pueden producir la desacetilación y degradación de la quitina (Aracely & Lopez, 2013; Synowiecki & Al-khateeb, 2010).

b. Desmineralización con una solución ácido

Se busca la solubilización del carbonato de calcio, utilizando diferentes tipos de ácidos fuertes como (HCl, HNO₃ o H₂SO₄) o débiles (CH₃COOH, HCOOH). Las concentraciones evaluadas varían desde 0.2M a 6 M a temperaturas de -20°C a 100°C, también se ha demostrado completa desmineralización del desecho cuando la concentración del ácido es estequiométricamente mayor que la de la cantidad de minerales (Aracely & Lopez, 2013).

c. Descoloramiento del producto

El pigmento no afecta el comportamiento del polímero en solución, su reactividad o propiedades fisicoquímicas, por lo que el blanqueo de la quitina solo se realiza cuando es indispensable tener un producto completamente puro. Por lo general para el descoloramiento se utilizan soluciones de hipoclorito de sodio, acetona absoluta, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos (Aracely & Lopez, 2013; Muxika et al., 2017).

De forma general, el quitosán es obtenido después del tratamiento de la quitina en un medio alcalino fuerte para remover el grupo acetilo, liberando el grupo amino. Además el quitosán puede ser obtenido de calamar de una manera más amigable con el ambiente, aunque con volúmenes más reducidos (Miranda & Lizárraga, 2012). En este proceso, los grupos acetil de la quitina son hidrolizados y convertidos en grupo aminos libres, este paso determina el grado de desacetilación que posee el quitosán de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que comúnmente es del 80% (Jiménez, 2016; Vakili et al., 2014).

La desacetilación de la quitina puede ser química o biológica (utilizando enzimas desacetilasas).

Existen dos tipos de desacetilación química: la desacetilación homogénea y la heterogénea, la primera se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de

la reacción pero la distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria. Por otro lado, la desacetilación heterogénea es aquella en la que se utilizan altas temperaturas (100 a 140° C) lo que favorece la velocidad de la reacción, sin embargo, la desacetilación se da con mayor rapidez en las regiones amorfas del biopolímero que en las áreas cristalinas impidiendo una mayor desacetilación. La presencia de oxígeno durante la desacetilación influye en la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos. El método químico de desacetilación del quitosán presenta 3 importantes desventajas, consume considerables cantidades de energía, se desperdician altas concentraciones de soluciones alcalinas y los productos finales presentan diversos pesos moleculares con heterogénea disposición de grupos acetilados en la molécula, dependiendo del tipo de desacetilación química aplicada (Aracely & Lopez, 2013; Synowiecki & Al-khateeb, 2010).

Una alternativa o proceso complementario a la desacetilación química es el uso de enzimas desacetilasas, que favorecen a que el proceso sea controlado y no degradativo. La enzima que cataliza la conversión de la quitina a quitosán tienen una especificidad muy estricta para los homopolímeros de N-acetilglucosamina por lo que se puede lograr una desacetilación extensa en los polímeros de quitina mediante la hidrólisis de los residuos de N-acetil glucosamina. Esta enzima se denomina quitina desacetilasa abreviadas como CDA y clasificada por la comisión de número de enzima (EC) como 3.5.1.41, donde el primer número la clasifica como enzima hidrolasa, que forma dos productos de un substrato por hidrólisis (fig. 13) (Aracely & Lopez, 2013; Kafetzopoulos, Thireos, Vournakis, & Bouriotis, 1993).

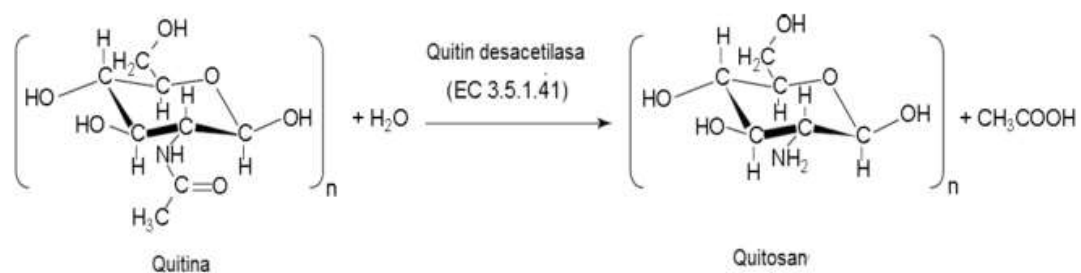


Figura 13. Desacetilación enzimática

1.3.3 Solubilidad

La quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes y en agua, sin embargo, se solubiliza en hexafluoroacetona y la N,N-dimetilacetamida (DMAc) conteniendo 5-8 % LiCl, además recientemente se ha reportado el uso de el metanol saturado con el cloruro de calcio dihidratado como disolvente. Estos disolventes pueden inducir el desequilibrio de los puentes de hidrogeno intramoleculares o repulsiones en la cadena, por esto son capaces de efectuar la disolución de esta molécula (Aracely & Lopez, 2013).

Por otro lado, el quitosán es insoluble en algunas soluciones alcalinas y disolventes orgánicos puros debido a los puentes de hidrogeno entre sus moléculas, sin embargo, es soluble en soluciones ácidas debido a la presencia de grupos amino libres que al ser protonados, generan repulsiones en la cadena promoviendo la solubilización. Como disolventes del quitosán se utilizan ácido acético, ácido fórmico, ácidos minerales concentrados como ácidos hidroclicóricos y nítricos, no obstante, el ácido sulfúrico no es conveniente debido a las atracciones iónicas entre la cadena producida por el anión divalente del sulfato. Estudios previos reportan que el peso molecular afecta la solubilidad, al aumentar el peso molecular la solubilidad disminuye, también depende en la concentración iónica, y es soluble en valores de pH menores a 6 (Aracely & Lopez, 2013; Domard & Rinaudo, 1983; Rinaudo, 2006; Vakili et al., 2014; Wypych, 2016).

1.3.4 Aplicaciones

Tratamientos de aguas industriales y efluentes

El quitosán posee grupos amino activos que pueden ser protonados con H^+ en agua y convertirse en un poli electrólito catiónico, por esto el quitosán puede ser usado para la remoción de varios iones de metales inestables en agua. Así mismo el quitosán es capaz de flocular partículas, es decir puede ser usado para la remoción de contaminantes orgánicos y sustancias sólidas suspendidas en el tratamiento de agua, encontrando algunas ventajas frente a los floculantes químicos tradicionales, como una mayor velocidad de floculación, menor dosificación, entre otras (Madrid, 2012). Se han investigado también sus propiedades absorbentes a los colorantes en las aguas teñidas (Vakili et al., 2014) y la aplicación del partículas de quitosán cargadas

con cobre para el tratamiento de aguas residuales (Wu, Liou, Yeh, Mi, & Lin, 2013; Yan et al., 2012).

Medicina

El quitosán, con sus numerosas propiedades, es uno de los polímeros bio-basados más prometedores para la entrega de fármacos, la ingeniería de tejidos y en la terapia génica. Es uno de los pocos polisacárido catiónicos en la naturaleza con un gran potencial médico innato. Se ha demostrado que el quitosán mejora la velocidad de disolución de fármacos poco solubles y, por tanto, puede explotarse para mejorar la biodisponibilidad de fármacos y su administración. Se han incorporado diversos agentes terapéuticos, tales como anticancerígenos, antiinflamatorios, antibióticos, antitrombóticos, esteroides, proteínas, aminoácidos, antidiabéticos y diuréticos en sistemas basados en quitosán para lograr la liberación controlada. El potencial de ingeniería tisular del quitosán como biomaterial para generar estructuras con tamaños de poro y tasas de degradación predecibles lo hace particularmente adecuado para la regeneración ósea y del cartílago. Otra propiedad de quitosán muy importante es su capacidad para unirse a moléculas aniónicas, tales como factores de crecimiento, glicanos de glucosamina y ADN. La capacidad de vincular el quitosán a moléculas de ADN como sustrato para matrices activadas por genes hace que este material sea un buen candidato en aplicaciones de genoterapia. De hecho, la combinación de la buena biocompatibilidad del quitosán, la actividad antibacteriana intrínseca, la capacidad de unirse a los factores de crecimiento y de procesarse en una variedad de formas, lo convierten en un candidato apropiado como material de andamio para la ingeniería de tejidos. (Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011)

Agricultura

En la agricultura el quitosán ha emergido como uno de los polímeros más prometedores para el suministro eficiente de agroquímicos y micronutrientes en nano partículas, además también es utilizado como biopesticida, para el tratamiento de semillas y crecimiento de las plantas (Wypych, 2016).

Las nanopartículas de quitosán han sido investigadas como portadoras de la administración de ingredientes activos para diversas aplicaciones debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta permeabilidad, rentabilidad, no toxicidad y excelente capacidad de formación de película, además es capaz de quelar diversos

compuestos orgánicos e inorgánicos, haciéndolo ideal para mejorar la estabilidad, la solubilidad y la actividad biocida de los fungicidas quelados u otros pesticidas. Aunque se requiere una mejor comprensión del destino y efecto del uso de los nano-pesticidas dichos después de su aplicación, un obstáculo importante en la agricultura sostenible es la eliminación de contaminantes nocivos del suelo, es aquí donde se cree que las propiedades únicas de nanopartículas de quitosán pueden resultar útiles, en sistemas de detección, detección y remediación ambiental. En general, se puede concluir que las nanopartículas de quitosán basadas en la tecnología tienen un futuro prometedor con valor en la productividad de los cultivos de manera sostenida y respetuosa del medio ambiente (Kashyap, Xiang, & Heiden, 2015).

Uso en alimentos y propiedades funcionales

El quitosán utilizado en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, como espesante, gelificante, emulsificante en alimentos y bebidas (Jiménez, 2016).

Por su actividad anti fúngica y antibacteriana el quitosán también se ha utilizado en recubrimientos de frutas y hortalizas, las películas de quitosán son flexibles, resistentes y duraderas, minimizando la velocidad de respiración y pérdida de agua del alimento, alargando la vida útil del producto (Leyva & Ruiz, 2004).

1.3.5 Polielectrólito

Los polielectrolitos son macromoléculas que al disolverlas en un solvente polar tienen un gran número de grupos cargados unidos covalentemente a ellos (Stuart, de Vries, & Lyklema, 2005).

La glucosamina ubicada en la parte dorsal del polímero es lo que le imparte su carácter poli catiónico (fig 14), por lo que el quitosán se sitúa con otros polielectrolitos usados como coagulantes y floculantes (Bough & Landes, 1976). El ajuste de pH de la solución a cerca de 7.5, por la adición de NaOH o NH₄OH causa la floculación debido a la desprotonación y la insolubilidad del polímero a pH neutro (Rinaudo, 2006).

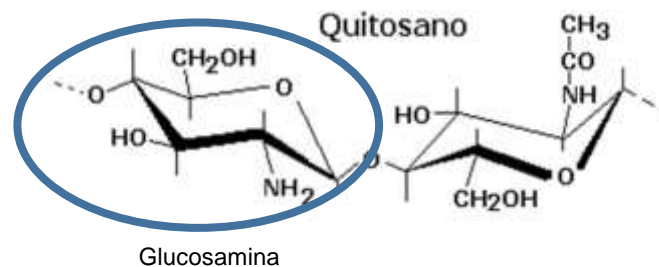


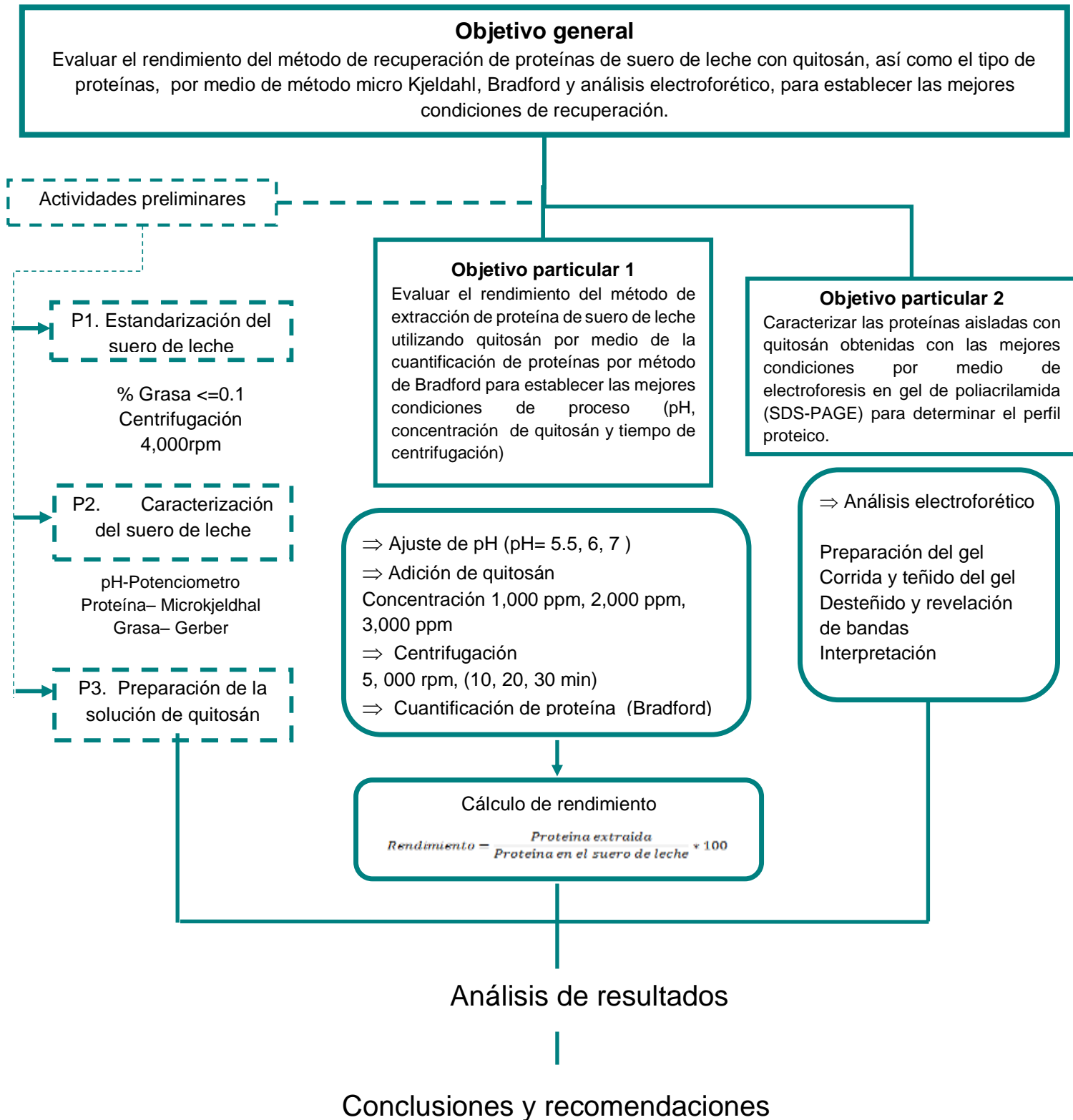
Figura 14. Glucosamina en quitosán.

Capítulo 2

Metodología



2.1 Cuadro metodológico



2.2 Objetivo general

Evaluar el rendimiento del método de recuperación de proteínas de suero de leche con quitosán, así como el tipo de proteínas, por medio de método micro Kjeldahl, Bradford y análisis electroforético, para establecer las mejores condiciones de recuperación.

2.2.1 Objetivo Particular 1

Evaluar el rendimiento del método de extracción de proteína de suero de leche utilizando quitosán por medio de la cuantificación de proteínas por método de Bradford para establecer las mejores condiciones de proceso (pH, concentración de quitosán y tiempo de centrifugación)

2.2.2 Objetivo Particular 2

Caracterizar las proteínas aisladas con quitosán obtenidas con las mejores condiciones por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar el perfil proteico.

2.3 Actividades preliminares

2.3.1 Suero de leche

2.3.1.1 Obtención del suero de leche.

México se encuentra en el noveno lugar de producción de queso a nivel mundial y que la demanda de queso en nuestro país ha alcanzado un consumo per cápita de 2.8 kg anual promedio, siendo los quesos Oaxaca y panela, los más consumidos en el país (Rodríguez & Durán, 2011). Debido a la creciente demanda de queso Oaxaca se trabajó con el suero obtenido de este, es decir, suero ácido.

El suero fue proporcionado por el Taller de Lácteos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ubicado en la Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Obtención del suero desgrasado

Método

Separación por centrifugación.

Fundamento

La centrifugación es un proceso de separación de mezclas heterogéneas cuyas fases tienen diferentes densidades. El principio físico que gobierna este proceso es la aceleración por efecto de fuerza centrífuga, la cual describe el movimiento de un cuerpo en un sistema de referencia en rotación esta fuerza ejercida sobre cualquier masa es equivalente al peso de la masa. Las centrífugas de discos son centrífugas de alta velocidad que se utilizan para la separación mecánica y la clarificación de mezclas de sólidos y líquidos. Estas máquinas, debido a su diseño especial, trabajan a velocidades más altas comparadas con otras centrífugas. Asimismo, el paquete de discos ofrece una alta superficie de clarificación (Berk, 2013).

Materiales y equipo

- Centrifuga de discos marca Didacta Italia modelo TAG 1/d

Procedimiento

1. Se colocaron los 76 discos de manera ascendente y en la posición correcta en el soporte de discos.
2. Se ensambló el tazón y los discos de manera adecuada, teniendo cuidado con el cierre del tazón y la tapa.
3. Se colocó el nivel en la parte superior para corroborar que estuviera nivelado.
4. Por último, se instaló la tolva de fracción soluble en insoluble, y el cinturón de seguridad.
5. Ya armada la centrifuga (fig. 15), se encendió la centrifuga y en el tablero de control se reguló la velocidad hasta llegar a 4,000 rpm sin ningún ruido extraño y siempre verificando que el sentido de giro fuese a la derecha.
6. Se abrió la llave del tanque de alimentación, el cual previamente se alimentó con el suero de leche (fig. 16).

7. Se obtuvo por un lado la grasa del suero y por otro el suero desgrasado, como se muestra en la figura 17.



Figura 15. Centrifuga de discos ensamblada



Figura 16. Centrifuga de discos en funcionamiento



Figura 17. Grasa del suero

2.3.1.2 Caracterización del suero de leche

Determinación de grasa

Método

Método Gerber

Fundamento

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol amílico, el cual actúa como un agente tensoactivo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa. El resultado se expresa directamente en por ciento de la grasa contenida en la leche (% w/v) es decir g de grasa/100 mL de suero de leche (NOM-155-SCFI-2012).

Materiales y equipo

- Tapones tipo Gerber, que consiste en un casquete de goma.
- Butirómetro
- Baño María

Procedimiento.

1. Se introdujeron 10 mL de ácido sulfúrico al 90% en el butirómetro.
2. Se agregaron 11 mL del suero a analizar y finalmente 1 mL de alcohol amílico al 98%.
3. La muestra contenida en el butirómetro fue agitada vigorosamente de tal modo que el suero y el ácido sulfúrico se mezclaran.
4. Al obtener una mezcla uniforme sin restos de caseína, se introdujo el butirómetro a la centrífuga.
5. Se centrifugó la muestra por 15 min.
6. Al finalizar la centrifugación, se sometieron las muestras a baño María a 60°C por aproximadamente 10min, tiempo necesario para permitir la separación total de la grasa.

7. Al remover el butirómetro del baño de agua se alzó verticalmente hasta que el menisco de la columna de grasa estuviera al nivel de los ojos y se registró el valor.

Esta prueba se realizó por triplicado a las muestras de suero inicial y al suero desgrasado.



a) Centrifugación de las muestras



b) Visualización del porcentaje de grasa

Figura 18. Método Gerber

Determinación de proteínas

Método

Determinación de Nitrógeno Total por Micro-Kjeldahl. Método 12.1.07. (A.O.A.C., 2000)

Fundamento

Se caracteriza por el uso de ácido sulfúrico concentrado a ebullición, que efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco. El amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado *in situ* o por destilación alcalina y titulación (Romero, 2006).

Procedimiento

1. En el matraz Kjeldahl, se colocó 2 mL de suero de leche, aproximadamente 1.9 g de sulfato de potasio, 40mg de óxido de mercurio y finalmente 2 mL de ácido sulfúrico.
2. Se llevó la muestra al digestor, donde permaneció hasta quedar totalmente transparentes.
3. La muestra digerida, se colocó en la cámara de ebullición del destilador, donde se agregó 10 mL de una solución de tiosulfato con hidróxido de sodio en agua.
4. Se recolectaron 40 mL de destilado, los cuales se recibieron en un matraz con 10 mL de ácido bórico y 2-3 gotas de indicador (azul y rojo de metilo)
5. El destilado obtenido se tituló con ácido clorhídrico 0.02N.
6. Se registró el volumen de ácido requerido en la titulación y se realizaron los cálculos que se muestran a continuación.

Cálculos

$$\%N = \frac{[(mLHCl - ml\ blanco) * Normalidad\ HCl * 14.007 * 100]}{mg\ de\ muestra}$$

$$\%Proteína = Ntotal * F$$

Donde:

El factor para productos lácteos F= 6.38 (Moraes Da Fonseca, 1999)

Determinación de pH

Materiales y equipo

Potenciómetro Horizo Ecology Co modelo 5997-20

Medición directa.

Fundamento

El pH es la forma en que se expresa la acidez o alcalinidad de una sustancia a partir de su concentración molar de protones o potencial de hidrógeno, es decir, que se utiliza como una unidad de medida para expresar la concentración de hidrones en una sustancia. La determinación de pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una fina membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones. El electrodo de referencia que se utiliza es el de calomel saturado con cloruro de potasio, el cual sirve como puente salino que permite el paso de los milivolts generados hacia al circuito de medición. La varita de soporte del electrodo es de vidrio común y no es conductor, mientras que el bulbo sensible, que es el extremo sensible del electrodo, está formado por un vidrio polarizable (vidrio sensible de pH). El voltaje en el interior del bulbo es constante, porque se mantiene su pH constante (pH 7) de manera que la diferencia de potencial solo depende del pH del medio externo, se mide la diferencia de potencial entre el electrodo de hidrogeno y el electrodo de referencia y se utiliza para calcular la concentración de ion H⁺ (Ciganda, Quim, & Bussi, 2004).

2.3.2 Quitosán

2.3.2.1 Preparación de la solución de quitosán

Materiales y equipo

- Matraz 250 mL
- Termoagitador Thermo Scientific modelo SP131325
- Mosca magnética pequeña

Procedimiento

Para la solución de quitosán al 1% en ácido acético.

1. Se prepararon 100 mL de solución de ácido acético al 1%.
2. Se añadió quitosán (obtenido del exoesqueleto de camarón, el cual fue tratado con las diferentes etapas de extracción de acuerdo a la patente 293022, perteneciente a la Doctora Susana Patricia Miranda Castro desarrollada en el laboratorio de Biotecnología en la FESC de la UNAM) al ácido acético para obtener una solución de quitosán al 1%.
3. La mezcla se agitó por 24h a temperatura ambiente.
4. En caso de quedar residuos, la solución se filtró para obtener un líquido libre de partículas.

2.4 Aislamiento de las proteínas de suero de leche utilizando quitosán.

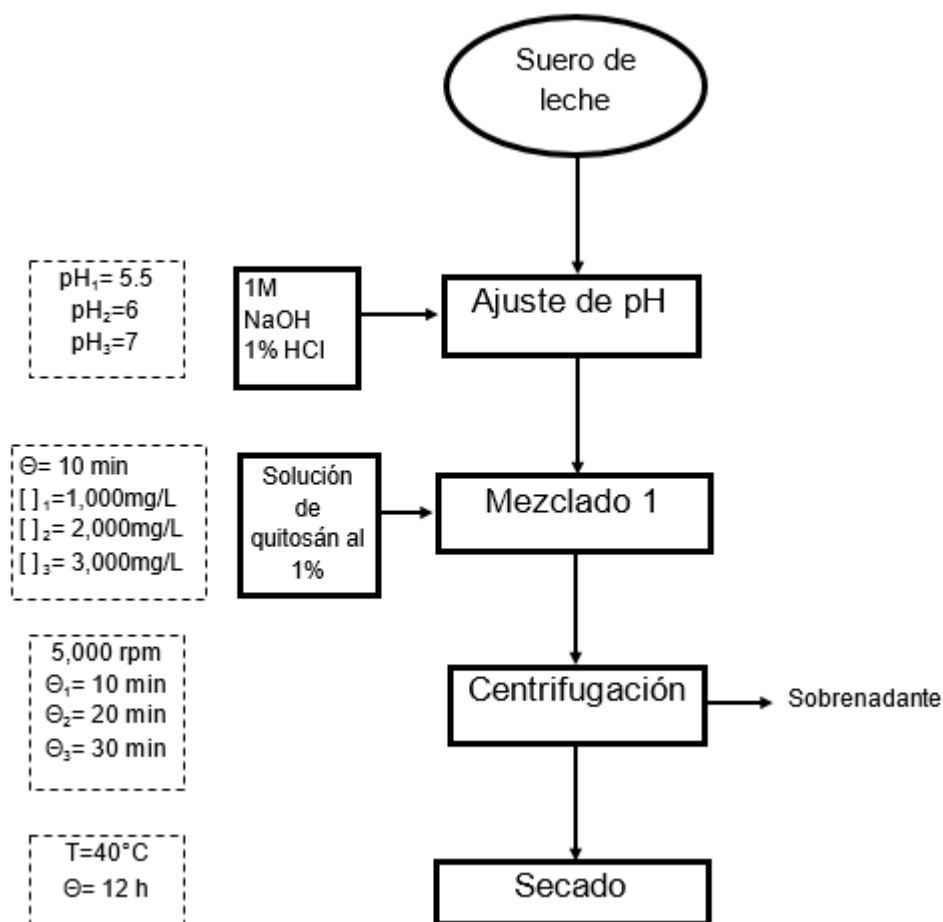


Figura 19. Diagrama general del proceso de aislamiento de las proteínas de suero de leche utilizando quitosán como agente de precipitación

Ajuste de pH

Materiales y equipo

- Potenciómetro Horizo Ecology Co modelo 5997-20
- Termoagitador Thermo Scientific modelo SP131325

Procedimiento

Se agregó al suero una solución de Hidróxido de sodio 1M o ácido acético al 1%, según fuera el caso, para obtener los pH de trabajo (5.5, 6 y7), partiendo de un suero con pH=4.6.

Mezclado

Materiales y equipo

- Mosca magnética
- Termoagitador Thermo Scientific modelo SP131325

Procedimiento

Se agregó la cantidad de solución de quitosán al 1% dependiendo de la corrida a trabajar, debido a la viscosidad de la solución de quitosán, las cantidades fueron agregadas en forma de gotas, cada gota con un peso aproximado de 14.6 mg.

Se mezcló en el termo agitador por 10 min a temperatura ambiente.

Centrifugación

Materiales y equipo

- Centrifuga Servall DuPont Rc-5 Superspeed Refrigerated
- Tubos para centrifuga de 250 mL
- Balanza de dos platos
- Embudo de separación,

Procedimiento

1. Se calibraron 6 tubos para centrifuga de modo que todos pesaran lo mismo incluyendo el recipiente (fig. 20).
2. Se utilizó la centrifuga Servall DuPont Rc-5 Superspeed Refrigerated centrifuge a 5,000 rpm por 10, 20 o 30 minutos según fuera el caso (fig 21).

3. La muestra centrifugada se muestra en la figura 22.
4. Para separarla se vertió en el embudo de separación y el precipitado se colocó en charolas de aluminio (fig. 23).
5. El líquido obtenido se refrigeró a 4°C para su posterior análisis y el precipitado se sometió a secado.



Figura 20. Calibración de tubos



Figura 21. Centrifugación



Figura 22. Muestra centrifugada



Figura 23. Precipitado

Secado

Equipo

- Estufa Quiney Lab modelo 30Gc Lab Oven

Procedimiento

El precipitado obtenido se sometió a un proceso de secado por estufa con aire caliente a 40°C por 18 horas, aproximadamente.

2.5 Determinación de proteínas

El sobrenadante restante de la precipitación se analizó utilizando el método de Bradford. La cantidad obtenida se sustrajo del porcentaje inicial de proteína en el suero y así se logró conocer la cantidad obtenida en el precipitado.

Método

Determinación de proteínas por Bradford

Fundamento

El método está basado en la observación de que el colorante azul Brillante de Coomasie G-250 presenta dos formas coloreadas, azul y rojo. El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína. La formación del complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora, por lo que el procedimiento es muy rápido y el tiempo para el ensayo no es limitante (García-Arellano & Vázquez-Duhalt, 1998).

Equipo

- Espectrofotómetro Marca Turner modelo 390

Procedimiento

1. Se preparó una curva patrón con la solución madre de albúmina bovina (ver apéndice A), con disoluciones como se muestra en la tabla 4.



Figura 24. Muestra para curva patrón Bradford.



Figura 25. Lectura de absorbancia.

Tabla 4. Curva patrón Bradford							
μl albumina	0	15	30	45	60	75	90
μl agua	450	435	420	405	390	375	360
μl total	450	450	450	450	450	450	450

También se hacen disoluciones de la solución problema, en este caso el sobrenadante de suero, tras la precipitación de las proteínas.

2. Se añadieron 4.5 mL del reactivo de Bradford (ver [Apéndice A](#)) a todos los tubos, a las diluciones de albúmina para construir la curva patrón, así como a las que contienen la solución problema diluida (fig. 24).
3. Agitar los tubos y se espera 2 minutos a que se forme el complejo colorante-proteína.
4. Se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (fig. 25).
5. Se construye la curva patrón (fig. 26) con las disoluciones de albumina.

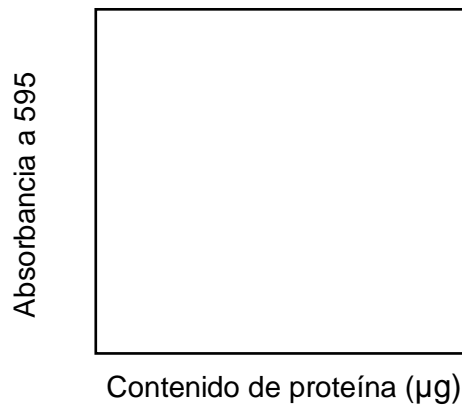


Figura 26. Curva patrón Bradford

6. Para conocer la cantidad de proteína en la solución problema, se interpolan los valores obtenidos de absorbancia en la curva patrón realizada con las disoluciones de albúmina.

2.6 Análisis electroforético (SDS-PAGE)

La muestra seca e hidrolizada se sometió a un análisis electroforético para determinar las proteínas presentes en el precipitado tomando como referencia el procedimiento de Laemmli (González de Buitrago, 2010).

Fundamento

Se denomina electroforesis al transporte de partículas cargadas en un campo eléctrico. Es una técnica de separación en la que las partículas cargadas se separan mediante la diferencia de su velocidad de migración. Los geles de agarosa, almidón y poliacrilamida no son sólo soportes que evitan la difusión, ya que, modificando la concentración de los componentes que forman el gel, pueden conseguirse diferentes porosidades y la separación, además de por diferencias de carga, se produce también por diferencias de tamaño (González de Buitrago, 2010).

Los geles de poliacrilamida se forman polimerizando el monómero acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y el comonómero de entrecruzamiento N,N'-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$). Variando las concentraciones del monómero y del comonómero de entrecruzamiento se consiguen geles de

poliacrilamida con poros de tamaño amplio. La electroforesis en gel se aplica en los laboratorios clínicos para separar proteínas, lipoproteínas, isoenzimas y ácidos nucleicos (González de Buitrago, 2010). La técnica SDS-PAGE, por sus siglas en inglés *Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*, es la más utilizada. Con esta técnica se asegura la desnaturalización total de la proteína utilizando el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). El tratamiento de la proteína a estudiar con 2-mercaptoetanol a 100°C por 5 minutos provoca la reducción de puentes disulfuro y como consecuencia la separación de las cadenas polipeptídicas, al mismo tiempo la cadena hidrocarbonada hidrófoba del SDS rodea las cadenas polipeptídicas orientando el ion sulfato hacia el medio acuoso, así las cadenas polipeptídicas tienen una carga negativa neta y quedan aisladas. La migración es proporcional a la carga y al tamaño, entonces a comparar con un patrón de pesos moleculares conocidos, se determina el peso molecular aparente de cualquier proteína (Pérez, Soriano, Ponce, & Díaz, 2015).

Equipo

- Cámara de electroforesis marca Bio-Rad modelo Mini-Protean Tetra Cell
- Thermoblock marca Lab-Line modelo Multiblock.
- Hoefer Scientific Mighty Bright transluminador
- Cámara Kodak

Procedimiento

1. Se colocaron los microlitros necesarios para obtener una muestra con 40µg en tubos Eppendorf junto con el mismo volumen de la solución digestora (ver [Apéndice B](#)), se mezclaron y se mantuvieron en ebullición durante 5 minutos en el Thermoblock.
2. Se colocó el buffer amortiguador pH=8.3 (ver [Apéndice B](#)) en la cámara interna, cubriendo la totalidad del casting, la misma solución se añadió a la cámara exterior hasta el límite de llenado.
3. Se utilizó un gel prefabricado de marca Bio-Rad, “Mini-PROTEAN® gel tipo TGX™ (Tris-Glycine eXtended shelf life)” con vida de anaquel extendida, compatible con los buffers convencionales del procedimiento Laemmli y Tris/Glicina/SDS.

- Con ayuda de una micro pipeta y una jeringa Hamilton, se agregaron 20µl del precipitado hidrolizado en el carril 3, en el carril 8 se agregó el precipitado en polvo y en el carril 5 se colocaron 5 µl de un marcador de peso molecular de 12 proteínas marca *Sigma-Aldrich*, con los siguientes pesos moleculares (fig. 27):

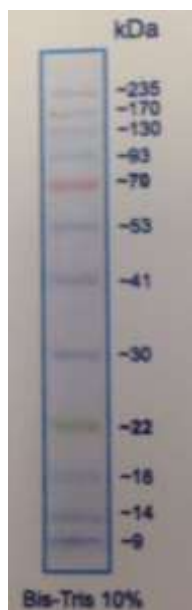


Figura 27. Pesos moleculares electroforesis

- Una vez cargadas las muestras, se cerró la cámara, se conectó a la fuente de poder y se estableció una corriente de 105 V (fig. 28).
- La cámara se apagó en el momento en que el colorante que sirve de referencia llegó al final del gel.
- Se retiró el buffer de la cámara y se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, para evitar la fractura del gel.
- Una vez desprendido el gel, se colocó en la solución teñidora (ver [Apéndice B4](#)) por aproximadamente 12 horas con agitación constante, posteriormente el gel se colocó en la solución desteñidora 1 (ver [Apéndice B5](#)) por aproximadamente 5 horas y por último se transfirió a la solución desteñidora 2 (ver [Apéndice B6](#)) para terminar con la completa eliminación del colorante y observar las bandas de proteína en el gel.
- El gel fue fotografiado en una cámara con transluminador marca Kodak, colocando una ligera capa de agua para evitar la adherencia del gel (fig. 29).



Figura 28. Cámara de electroforesis



Figura 29. Transluminador y cámara Kodak

2.7 Diseño estadístico

Se optó por la utilización del diseño Taguchi, ya que es un método para diseñar experimentos que usualmente requieren sólo una fracción de las combinaciones factoriales completas. Aunque este diseño es normalmente utilizado para mejorar la calidad de algunos procesos, es también muy útil para predecir resultados sin necesidad de hacer muchos experimentos, en este caso para predecir las condiciones con las que se obtenga el mayor rendimiento. Se utilizó un diseño simplificado, ya que usualmente se utiliza este diseño una vez puesto en marcha el proceso y por lo tanto se tiene más conocimiento de los procesos, como los factores de ruido, interacciones entre las distintas variables, factores financieros, por mencionar algunas, que en este caso no se tenían y tratar de encontrarlas haría más complejo el experimento (Cordova, 2005; Gutiérrez & de la Vara, 2012). Además, este diseño nos permitió trabajar con más factores y niveles de variación por factor, con un menor número de corridas, así se tiene una visión más amplia de este proceso y se puede hacer una mejor elección de las mejores condiciones.

La selección de variables y niveles de variación fue un paso importante para la creación del diseño, esta decisión se basó en estudios previos de la recuperación de las proteínas utilizando quitosán. La primera investigación en 1976 se variaron pH, concentración de quitosán, y tiempo de mezcla (Bough & Landes, 1976),

posteriormente se profundizó el estudio de este proceso utilizando variables como concentración y procedencia del quitosán, tiempo de mezcla, pH, tiempo de sedimentación, sin embargo en este trabajo las variables son evaluadas por separado, es decir se llegó a las mejores condiciones, pero nunca se comprobó su eficacia en conjunto (Kennedy, Paterson, Tylor, & Silva, 1994), también en la Universidad Estatal de Oregón trabajaron con complejos de quitosán-polianión para la coagulación de las proteínas del suero (Savant & Torres, 2000), en el estudio más reciente se investigaron por separado el efecto de la concentración de quitosán y el pH de trabajo para el aislamiento de la β -lactoglobulina (Casal, Montilla, Moreno, Olano, & Corzo, 2006).

Se hizo una recopilación de los resultados obtenidos en estos estudios, así como las etapas que se utilizaron en cada estudio para la recuperación de las proteínas, con esta información se elaboró el diagrama de flujo que se muestra en la figura 19, así mismo se destacaron como variables significativas el pH y concentración de quitosán, y el tiempo de centrifugación.

La experimentación se llevó a cabo con un mismo tipo de suero, suero ácido, al cual se determinó inicialmente el porcentaje de proteínas por medio del método Kjendahl, posteriormente se hizo el tratamiento con quitosán, variando pH, concentración de quitosán y tiempo de centrifugación, se hicieron 9 tratamientos diferentes (tabla 5), en cada tratamiento se hicieron 3 repeticiones de 250 ml cada una. Al término de la precipitación, se obtuvo un sobrenadante y un precipitado, el primero se utilizó para hacer la determinación de porcentaje de proteína mediante la técnica de Bradford, es importante mencionar que, debido al contenido de nitrógeno del quitosán, el método micro Kjendahl era poco confiable, ya que estaría midiendo el porcentaje de nitrógeno de las proteínas en conjunto con el del quitosán, por esto se optó por otra técnica. El precipitado se sometió a secado y posteriormente se calculó la cantidad promedio de precipitado obtenido por litro de suero. Finalmente, se hizo un análisis electroforético, tomando como referencia el procedimiento de Laemmli, al precipitado seco para conocer las proteínas que se aislaron con este método.

Tabla 5. Diseño experimental para la precipitación de proteínas con quitosán

Corrida	pH	[] Q (mg/L)	Tiempo (min)
1	5.5	1,000	10
2	6	2,000	10
3	7	3,000	10
4	6	1,000	20
5	7	2,000	20
6	5.5	3,000	20
7	7	1,000	30
8	5.5	2,000	30
9	6	3,000	30

Capítulo 3



Resultados
y discusión

3.1 Actividades preliminares.

Caracterización del suero de leche

Una vez recolectado el suero, se sometió a centrifugación para remover la mayor cantidad de grasa posible, ya que se ha reportado a pH superior a 6.3, el uso de quitosán para la reducción de lípidos, por las interacciones iónicas que se presenta entre grupos amino cargados positivamente de quitosán y grupos de ácidos grasos y lípidos cargados negativamente (Synowiecki & Al-khateeb, 2010; Ventura, 1996), por lo que estas interacciones podrían disminuir la cantidad de proteína aislada por el quitosán. Además la grasa es un componente indeseable en los concentrados proteicos debido a que contribuye a la alteración de sabores en el producto almacenado (Souza et al., 2008).

Una vez obtenido el suero desgrasado, se mantuvo en refrigeración (4°C) para el posterior aislamiento de las proteínas.

Por medio de la técnica micro Kjeldahl, se analizó el porcentaje proteico del suero antes y después del desgrasado para asegurarse de que no hubiera pérdidas mayores de proteínas, así como para verificar que los valores estuvieran dentro de los aceptables.

Así mismo, se determinó el contenido de grasa de ambos sueros (antes y después del desgrasado) para cerciorarse que el suero tuviera la menor cantidad de grasa posible.

En la tabla 6, se muestra la caracterización de ambos sueros, así como los valores registrados en la norma.

Tabla 6. Caracterización del suero de leche

Parámetro	Muestra	Suero inicial	Suero desgrasado	NMX-F-721-COFOCALEC-2012
Proteína (%)	1	0.961	0.857	Mínimo 0.72
	2	0.837	0.796	
	3	0.899	0.822	
	Promedio	0.899	0.825	
	Desviación estándar	0.062	0.030	
	Coeficiente de variación	6.903	3.722	
Grasa (%)	1	0.5	0	0.1
	2	0.5	0	
	3	0.6	0	
	Promedio	0.533	0	
	Desviación estándar	0.057	---	
	Coeficiente de variación	10.825	---	
pH	----	4.8	4.8	< 6.4

El valor promedio del contenido proteico una vez desgrasado el suero rebasa el límite inferior de la norma, por lo que se puede decir que éste no ha sido adulterado y es apto para el posterior procesamiento, así mismo, por el valor de pH, se corroboró que el suero del trabajo entra dentro de la clasificación de suero ácido.

La centrifugación fue útil para la purificación del suero en términos de componentes extraños, es decir, se eliminaron componentes ajenos al suero, como las caseínas, que puede quedar suspendidas en el suero en menor cantidad, a pesar de pasar por una filtración, no siempre se retienen las caseínas coaguladas, esto explica la

reducción del contenido de proteína antes y después del desgrasado. Esta reducción también se debe a la pérdida de las MFGM (por sus siglas en inglés “Milk Fat Globule Membrane” proteínas de la membrana del glóbulo graso), estas proteínas usualmente son desechadas de la leche en la elaboración de mantequilla, sin embargo debido a que la leche con la que se elaboró el queso Oaxaca y el suero lácteo, no fue previamente desengrasada ni procesada para obtener mantequilla, durante la elaboración del queso, estas proteínas quedaron en el suero junto con la grasa láctea, posteriormente al desgrasar el suero, estas proteínas fueron eliminadas. Esta reducción de 0.074% corresponde a la fracción aproximada de las proteínas de la MFGM, es decir 10 veces menos a la fracción de las proteínas de suero de leche (en este caso 0.825 %). A pesar de que estas proteínas se encuentran en mayor cantidad en el suero de mantequilla, Rombaut & Dejonckheere, reportan fragmentos de la membrana en el suero de leche (García, Montiel, & Borderas, 2014; Pérez & Sánchez, 2012; Rombaut, Dejonckheere, & Dewettinck, 2007).

3.2 Objetivo particular 1

Una vez precipitadas las proteínas por el quitosán, éstas se secaron, se pesaron y se promediaron ya que se hicieron 4 repeticiones por corrida, en cada corrida se utilizaron 250 mL de suero. En la tabla 7, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Cantidad de precipitado con quitosán			
Corrida	Promedio (g/L)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
1	4.261	0.159	3.731
2	4.332	0.187	4.324
3	4.165	0.182	4.375
4	4.069	0.029	0.701
5	4.114	0.117	2.836
6	4.469	0.159	3.554
7	3.730	0.005	0.012
8	4.118	0.094	2.280
9	4.333	0.165	3.808

También mediante la técnica de Bradford se obtuvo la cantidad de proteína que quedó en el sobrenadante, las unidades se manejaron en gramos de proteína por litro. A partir de estos datos se obtuvo la cantidad de proteína en el precipitado y el rendimiento total del procedimiento (ver [Apéndice C](#)).

Tabla 8. Proteína obtenida y rendimiento

Corrida	Proteína obtenida en el Sobrenadante (g/L) Técnica Bradford	Precipitado (g/L)	Proteína precipitada (g/L) Técnica Bradford	% de proteína en el precipitado	Rendimiento % $\left(\frac{\text{Proteína precipitada}}{\text{Proteína inicial del suero}} \right)$
1	4.922	4.261	3.328	78.087	40.335
2	4.859	4.332	3.391	78.271	41.099
3	5.261	4.165	2.989	71.756	36.225
4	5.685	4.069	2.565	63.049	31.094
5	4.712	4.114	3.538	86.009	42.885
6	4.959	4.469	3.291	73.640	39.895
7	5.084	3.730	3.166	84.880	38.377
8	4.818	4.118	3.432	83.340	41.600
9	4.987	4.333	3.263	75.309	39.556

Se parte de un contenido de proteína en el suero inicial de 8.25 g/L.

*Se reportan los promedios, con un coeficiente de variación no mayor a 5%, obtenidos de las determinaciones de concentración de proteína en el sobrenadante y cantidad de precipitado obtenida.

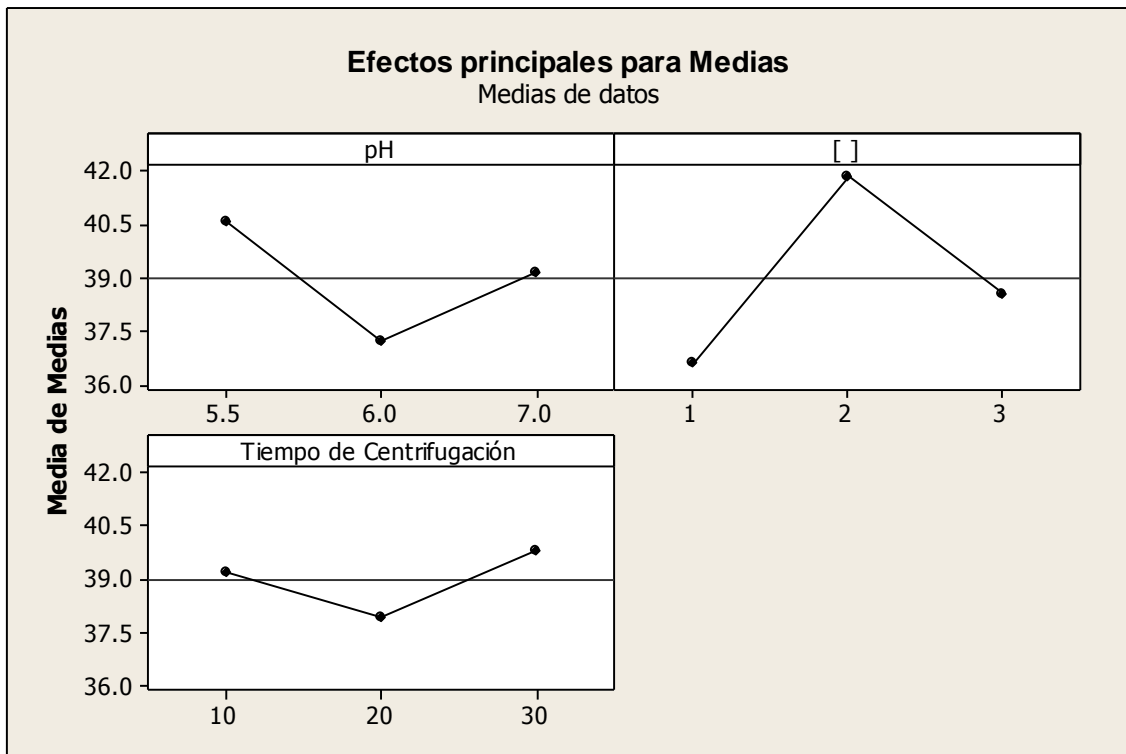


Gráfico 2. Efectos principales para medias

Con los resultados obtenidos y con ayuda del software Minitab 16, se pronosticó un rendimiento máximo de 44.301% con un pH de 5.5, concentración de 2,000 mg/L, y un tiempo de centrifugación de 30 minutos como se muestra en la gráfica 2, en la cual se muestra la media calculada por cada factor, es decir para el pH de 5.5 por ejemplo, el programa pronosticó los resultados del rendimiento, dejando constante el valor de pH 5.5 y variando el tiempo de centrifugación y la concentración de quitosán y así sucesivamente para cada nivel de variación de cada factor.

La efectividad de este método se basa principalmente en encontrar un punto en que el quitosán esté disponible para atraer al mayor número de proteínas posible, esto se hace principalmente controlando el pH y la cantidad de quitosán que se adiciona.

El pH de trabajo es una variable importante, ya que determina la carga de los componentes involucrados (quitosán y proteínas de suero de leche), se buscó un pH donde ambos componentes tuvieran cargas opuestas para hacer más efectiva la extracción, dado que en un pH de 5.5, 6 y 7, la mayoría de las proteínas están encima de su punto isoeléctrico por lo tanto tienen una carga negativa, lo que hace posible que formen un complejo con el quitosán cargado positivamente.

Mientras más básico el pH del sistema, las proteínas tienen más cargas negativas, entonces son más propensas a formar complejos con el quitosán, sin embargo en el valor de pH 5.5 se reportó una mayor cantidad de proteínas aisladas, esto es porque también se debe considerar que el quitosán tiene un pK de 6.3 (Fernández & Fox, 1997) por lo tanto a pH ácido este polímero es poli catiónico y puede formar complejos con las proteínas cargadas negativamente. Entonces con el pH más ácido (pH=5.5) la propiedad el carácter poli catiónico del quitosán es fuerte y la carga de las proteínas es la suficiente para ser atraídas por el quitosán, por ello se tiene el mayor rendimiento, aunque a pH neutro las proteínas son más propensas a ser atraídas por cargas positivas, el quitosán pierde carga positiva y disminuye la capacidad de atraer a las proteínas. Además Mounsey y colaboradores, encontraron que al incrementar el pH arriba de 6.5, la β -lactoglobulina dispersada con quitosán la cantidad de proteína soluble incrementó, por lo que posiblemente a pH neutro una parte importante de esta proteína se quedó en la solución sobrenadante (Mounsey, O'Kennedy, Fenelon, & Brodkorb, 2008).

La recuperación de las proteínas disminuyó al estar la solución a pH 6, donde ambos componentes están en la disponibilidad de formar complejo, sin embargo, la solubilidad del quitosán es limitada cuando se acerca al pK_a, lo que provoca una disminución en la capacidad de vinculación con las proteínas, por lo tanto, a pH= 6 disminuye esta capacidad resultando en un menor rendimiento.

Estudios previos, encontraron como concentración óptima 1,000 mg/L (Kennedy et al., 1994), sin embargo en este estudio no se probaron concentraciones superiores. Casal y colaboradores estudiaron el efecto de concentraciones entre 1,900-4,000 mg/L para la remoción selectiva de β -lactoglobulina, y concluyeron que las concentraciones superiores a 3,500 mg/L resultaban en la parcial restabilización de las proteínas, un fenómeno debido a la sobredosis de biopolímero. En este estudio se encontró que utilizando 2,000 mg de quitosán por litro de suero se obtiene un mayor rendimiento.

La concentración de quitosán tiene una relación proporcional con la cantidad de proteína extraída, que se ejemplifica en el incremento de rendimiento entre la concentración de 1,000 mg/L y 2,000 mg/L, sin embargo se alcanza un punto de máxima dosificación, al añadir un exceso de quitosán provoca que la superficie se sature con el polímero adsorbente y las partículas se restabilizan, muchos sitios de adsorción por partícula serán ocupados y no solo se previene la formación de puentes también las partículas se vuelven estéricamente estables.

En la gráfica 2, se muestra un decremento de proteína extraída a la concentración de 3,000 mg/L, esto indica una sobredosis de quitosán dosificado, por lo que la dosificación máxima se encontraría posiblemente entre 2,000-3,000 mg/L.

Con respecto al tiempo de centrifugación, el máximo tiempo de centrifugación fue con el que se obtuvo mayor rendimiento, podríamos decir entonces que a mayor tiempo de centrifugación mayor recuperación de proteínas, sin embargo, al observar el gráfico 2, encontramos una mayor extracción al centrifugar por 10 minutos que al centrifugar con 20.

Si bien, el porcentaje de recuperación obtenido por este método no rebasa el porcentaje aceptado para su rentabilidad comercial (al menos 50% de la proteína cruda) no se puede descartar el uso del quitosán para la recuperación de proteínas del suero de leche, las ventajas de este método, como bajo costo de operación y la simplicidad del método, lo hacen factible para su posterior estudio y optimización.

Es importante recalcar que los porcentajes de proteína que se muestran son aproximados, ya que se hicieron pruebas previas con ambas técnicas (micro Kjeldahl y Bradford) de las cuales se concluyó que, debido a la presencia de quitosán, las determinaciones de proteína presentaban variación con respecto a las que solo contenían proteína de suero. Se recomienda hacer un análisis más detallado del precipitado para determinar de manera puntual la cantidad de proteína así como la cantidad de quitosán.

3.3 Objetivo particular 2

En la figura 30 se muestra el análisis electroforético obtenido del precipitado, en el carril izquierdo se muestra el indicador de pesos moleculares, y en el carril de lado derecho se muestra el precipitado en polvo, en un inicio también se corrió en un tercer carril el precipitado hidrolizado, sin embargo, debido a la baja solubilidad del precipitado obtenido, la muestra hidrolizada no era homogénea y posiblemente no contenía la cantidad suficiente de proteínas por lo que la visualización de las bandas no fue posible.

Por su peso molecular se pueden identificar de β -lacto globulina y α -lacto albumina, ambas con un peso menor a 22 kDa, albumina sérica y lactoferrina, aproximadamente 70 y 80 kDa respectivamente, en 53 kDa.

Siendo la β -lactoglobulina la proteína, aproximadamente 50% de las proteínas totales, y dado que el rendimiento máximo no sobrepasó el 45% del total de las proteínas, podemos hablar solo de una recuperación parcial de esta proteína mayoritaria. Se afirma que aún en la saturación no todos los grupos de esta proteína cargados negativamente interactúan con el quitosán, más aún si hay más componentes en el medio (Mounsey et al., 2008).

La albúmina sérica posee un gran número de puentes disulfuro y pueden reaccionar con la β -lactoglobulina, al estar la albúmina sérica y la β -lactoglobulina unidas, la capacidad de la β -lactoglobulina para unirse con el quitosán disminuye, en menor cantidad se precipitan la β -lactoglobulina y la albumina sérica, explicando la aparición de esta proteína.

Aunque con este análisis electroforético no es posible saber la cantidad exacta de cada proteína presente, estudios sugieren que la proteína mayoritaria del lactosuero tienen una mayor afinidad al quitosán que la α -lactoalbúmina, por lo que podemos decir que en este precipitado tenemos un mayor contenido de β -lactoglobulina que de α -lactoalbúmina (Lee & Hong, 2009).

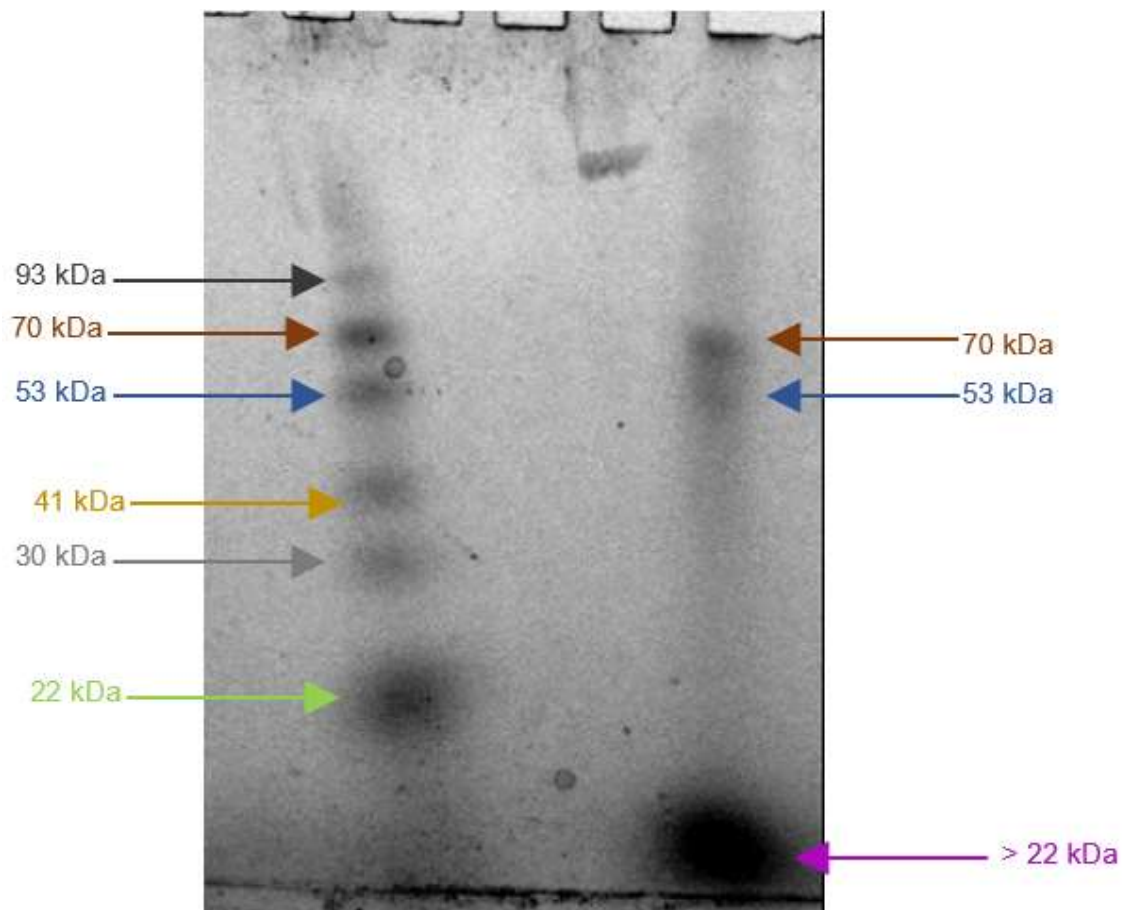


Figura 30. Análisis electroforético

Usualmente los concentrados proteicos contienen una mayor parte de las proteínas del suero de leche (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina y BSA), por lo que comparando, el método supone una composición similar a los concentrados obtenidos por otros métodos. Hay que tener en cuenta que las temperaturas para la precipitación nunca rebasaron los 40°C por lo que la desnaturalización por temperatura no ocurrió, en comparación con otros métodos, por ejemplo del método tradicional con tratamiento térmico donde se utilizan temperaturas mayores a 90°C, donde la estructura nativa se ve afectada y por lo tanto las propiedades funcionales y la actividad biológica (Santos et al., 2012).

Existen también métodos no tan dañinos a la estructura de la proteína como la micro o ultrafiltración, sin embargo, las limitantes de este proceso son la productividad y los altos costos de operación, debido a que estos tratamientos requieren cierto tiempo para limpiar la membrana, la cual tiene un costo elevado. Teniendo en cuenta que la precipitación de las proteínas por la desnaturalización inducida por calor y la ultra y microfiltración son las dos técnicas utilizadas hoy en día, la ventaja que supone el uso

de quitosán es la simplicidad en su operación, así como las características finales del precipitado sin desnaturalizar.

El uso de este proceso puede ser factible en industrias pequeñas, donde la tecnología y el capital con la que cuentan no es suficiente para instalar un sistema de recuperación de suero más sofisticado como ultrafiltración o algún tratamiento térmico, así se lograría tener un ingreso a partir de lo que antes era un desecho, a la vez que se minimiza la contaminación.

Conclusiones

- Se comprobó la capacidad del quitosán para recuperar las proteínas de suero de leche, utilizando un suero ácido obtenido de la elaboración de queso Oaxaca sin pasteurizar, se obtuvo un máximo de 45% aprox. de las proteínas originales del suero de leche, bajo las condiciones estudiadas.
- El mayor rendimiento se obtuvo al trabajar con 2,000mg de quitosán por litro de suero, 30 minutos de centrifugación y con un pH de trabajo de 5.5, los resultados demuestran que la concentración ideal oscila entre 2,000-3,000mg/L, además el tiempo de centrifugación se puede incrementar, modificando estas condiciones se podría mejorar el rendimiento, por lo que este proyecto puede ser utilizado como base para estudios posteriores para la optimización de este proceso.
- Se logró obtener el perfil proteico del precipitado obtenido, recuperando proteínas de gran valor tanto nutricional como funcional, como lo son la β -lacto globulina y α -lacto albumina, albumina sérica y lactoferrina.

Recomendaciones

- Para obtener mayor rendimiento en la recuperación de proteínas con el uso del quitosán, recomendaría estudiar el efecto del pH del suero y las diversas proteínas que contiene, ya que cada proteína tiene diferente pK y su precipitación se puede ver influenciada por el polícatión quitosán.
- También sugiero estudiar una precipitación con quitosán en forma diferencial es decir, por un lado se precipitaran las caseínas que aún quedan en el suero y por otro lado la precipitación de las proteínas mayoritarias en el suero.
- Así mismo se puede estudiar el incrementar los tiempos de centrifugación por lo que este proyecto puede ser utilizado como base para estudios posteriores para la optimización de este proceso.
- No se logró tener una técnica de evaluación concreta para proteínas que contuvieran quitosán ya que ambas técnicas tanto la de Kjeldahl como la de Bradford detectan el quitosán también.
- Se recomienda realizar un análisis de costos de esta manera se podrá ver la eficacia del proceso desde el punto de vista financiero y así tener un panorama más amplio del proceso y tener las variables suficientes para su optimización.
- De igual forma podría ser interesante conocer las propiedades funcionales de las proteínas unidas al quitosán como capacidad gelificante, espumante y emulsificante, para así tener distintas formas de comercialización.

Referencias

- A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. USA: AOAC International Edition.
- Adolfo, R., & Huertas, P. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos, 62(1), 4967–4982.
- ADPI/ABI. (2009). International Whey Market Overview. Retrieved from <https://www.adpi.org/Portals/0/PDF/09Conference/TAGEAFFERTSHOLT.pdf>
- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. (A. Lacasa, Ed.) (4°). México: Editorial Reverté, S.A.
- Albizú, C., & Ac, M. (2011). *Desarrollo de un recubrimiento comestible a base de proteína de suero de leche para queso Cheddar*. Zamorano.
- Alomirah, H. F., & Alli, I. (2004). Separation and characterization of b -lactoglobulin and a -lactalbumin from whey and whey protein preparations, 14, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.09.006>
- Aracely, N., & Lopez, P. (2013). *Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos : caracterización y aplicación*. Université Claude Bernard - Lyon I/ Universidad Autónoma Metropolitana.
- Aumenta producción de camarón 65.5 por ciento en cuatro años. (2017). Retrieved September 7, 2017, from <http://www.excelsior.com.mx/nacional/2017/04/10/1156971>
- Austin, P., & Sennett, S. (1986). Dry chitosan salts and complexes of aliphatic carboxylic acids. In R. . Muzzarelli, C. Jeuniaux, & G. Gooday (Eds.), *Chitin in nature and Technology* (pp. 279–283). London: Plenum Press.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos. Química de los alimentos*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Berk, Z. (2013). Centrifugation. *Food Process Engineering and Technology*, 241–257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00009-5>
- Boland, M., & Zealand, N. (2011). *Whey proteins. Handbook of food proteins*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.30>
- Bough, W. A., & Landes, D. R. (1976). Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *Journal of Dairy Science*, 59(11), 1874–80. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84456-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84456-6)

- Campos, A. (2017). *Evaluación financiero-productiva para el establecimiento de un planta procesadora de lactosuero para evitar la contaminación de agua y suelo, en el municipio de Acatlán, Estado de Hidalgo, México, 2014*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Casal, E., Montilla, A., Moreno, F. J., Olano, A., & Corzo, N. (2006a). Use of chitosan for selective removal of beta-lactoglobulin from whey. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1384–9. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72206-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72206-8)
- Casal, E., Montilla, a., Moreno, F. J., Olano, a., & Corzo, N. (2006b). Use of chitosan for selective removal of β -lactoglobulin from whey. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1384–1389. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72206-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72206-8)
- Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A., & Espinoza, A. (2008). *Los quesos Mexicanos Genuinos* (1a ed.). México D.F.: Grupo Mundii-Prensa.
- Chamorro, M. (2012). Fundamentos tecnológicos de la elaboración de queso. Retrieved May 24, 2017, from <http://racve.es/publicaciones/fundamentos-tecnologicos-de-la-elaboracion-de-queso/>
- Choi, C., Nam, J. P., & Nah, J. W. (2015). Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.10.028>
- Ciganda, L. M., Quim, I., & Bussi, J. (2004). Electrodo para medir pH (Junio 2004). *Electrodo Para Edir pH*, (Junio), 1–5.
- COFOCALEC. (2012). Proyecto de norma mexicana PROY-NMX-F-721-COFOCALEC, 1–12. Retrieved from [http://www.canilec.org.mx/Circulares 2012/93del12/PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2011 220312.pdf](http://www.canilec.org.mx/Circulares%202012/93del12/PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2011%2020312.pdf)
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10(1–2), 52–78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>
- Cordova, S. (2005). *Calidad en las organizaciones (Empresas e instituciones de prodección y de servicios). Optimización del proceso de etoxiquin por diseño de experimentos método Taguchi*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., & Bhattacharjee, C. (2016). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.05.006>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>

- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597–608. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75613-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9)
- Díaz, O., Pereira, C. D., & Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.003>
- Domard, A., & Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(1), 49–52. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(83\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(83)90078-8)
- Fernández, M., & Fox, P. (1997). Fractionation of cheese nitrogen using chitosan. *Food Chemistry*, 58(4), 319–322.
- Flores, S. (2012). Coalición de organizaciones por el derecho del agua. Retrieved April 11, 2016, from <http://www.comda.org.mx/page/3/>
- Fontecha et al, F. (2010). Avances en la investigación de la alimentación funcional. / *Jornada CYTED-IBEROFUN Sobre Alimentación-Salud Mexico 2010*, 209.
- García-Arellano, H., & Vázquez-Duhalt, R. (1998). Cuantificación De Proteínas: Una Revisión. *Instituto de Biotecnología, UNAM*, 3, 78–88.
- García-Betanzos, C. I., Hernández-Sánchez, H., Bernal-Couoh, T. F., Quintanar-Guerrero, D., & de la Luz Zambrano-Zaragoza, M. (2017). Physicochemical, total phenols and pectin methylesterase changes on quality maintenance on guava fruit (*Psidium guajava* L.) coated with candeuba wax solid lipid nanoparticles-xanthan gum. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.065>
- García, C., Montiel, R., & Borderas, T. (2014). Grasa Y Proteína De La Leche De Vaca: Componentes, Síntesis Y Modificación. *Arch. Zootec*, 63, 85–105.
- García, M. . Q. R. . L.-M. A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa.
- Garza, G. (2014). Boletín 15: Microbiota Intestinal y Leche de Vaca – Dr. Guillermo Garza Mtz | Pediatra, Diplomado en Nutrición y Obesidad UNAM. Retrieved August 30, 2017, from <http://www.muysano.mx/boletin/microbiota-intestinal-y-leche-de-vaca/>
- González, D. (2017). *Aislamiento y caracterización de proteínas de lactosuero para la elaboración de una bebida carbonatada con contenido proteico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González de Buitrago, J. M. (2010). Electroforesis. *Técnicas Y Métodos de Laboratorio Clínico*, 211–217. <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2029-2.50015-X>

- Green, J y Kramer, A. (1979). *Food Processing Waste Management*. Connecticut: AVI Publishing Company.
- Gutiérrez, H., & de la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. (P. Roig, Ed.) (3a.). México: McGrawHill.
- Hernanández, I. (2014). *Establecimiento de las condiciones óptimas de obtención de requesón a partir de lactosuero dulce y ácido de ganado bovino y caprino*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández, I. (2011). *Validación para la determinación de proteínas en alimentos por el método micro-Kjeldahl*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández, T. (2012). *Efecto de las interacciones proteína-proteína (Clara de huevo-soya, suero de leche y gretina) en una espuma sólida*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hill, a. R., Irvine, D. M., & Bullock, D. H. (1982). Precipitation and Recovery of Whey Proteins: A Review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 15(3), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(82\)72529-5](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(82)72529-5)
- Holsinger, V.H. y Posati, L. P. & D. (1967). Whey beverages: a review. *Journal of Dairy Science*, 57.
- Ikeda, S. (2003). Heat-induced gelation of whey proteins observed by rheology, atomic force microscopy, and Raman scattering spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 399–406. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00033-X)
- Jiménez, M. (2016). *Desarrollo de un alimento funcional en forma de golosina tipo gomita a base de quitosán, nopal y xoconostle*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jornada, L. (2014, April 23). Con desecho lactosuero producen suplementos alimenticios y plástico biodegradable. 08 Nov 2014. México, DF.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N., & Bouriotis, V. (1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8005–8008. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8005>
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>
- Kennedy, J., Paterson, M., Tylor, D., & Silva, M. (1994). Recovery of proteins from whey using chitosan as a coagulant. In C. Gebelein (Ed.), *Biotechnology and bioactive Polymers* (1st ed., pp. 55–69). New York: Plenu Press.

- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2002). *Whey proteins. Proteins in food processing*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.72>
- L Pérez, M., Soriano, J., Ponce, E., & Díaz. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. *Nacameh*, 9(2), 77–96. Retrieved from http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v9n2/Nacameh_v9n2_077_PerezCh-etal.pdf
- Lee, A., & Hong, Y. (2009). Coacervate formation of a-lactalbumin–chitosan and b-lactoglobulin–chitosan complexes, 42, 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.022>
- Leyva, A., & Ruiz, E. (2004). *Efecto del tratamiento de películas elaboradas a base de quitosán y aditivos, sobre aguacates variedad Hass (Persea Americana Mill) durante el almacenamiento*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Liu, C., & Bai, R. (2014). Recent advances in chitosan and its derivatives as adsorbents for removal of pollutants from water and wastewater. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 4, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2014.01.004>
- Lucena, M. E., Alvarez, S., Men, C., Riera, F. A., & Alvarez, R. (2007). α-Lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates, 52, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.05.024>
- Lucey, J. A. (2002). Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Lundstedt, E. (1971). *Milkway- a new process for utilization whey*. Cultured Dairy Prod.,.
- Madrid, E. I. (2012). *Propiedades coagulantes y/o floculantes del quitosán como alternativa de tratamiento de agua residual del taller de cárnicos de la FES Cuautitlán*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mahaut, M.; Jeantete, R.; Brulé, G. (2003). *Introducción a la tecnología quesera*. (S. Ruíz, Ed.) (1st ed.). Zaragoza: Editorial Acirbia.
- Milke, M., & González, A. (2016). *1 Foro Internacional de la Leche y la Salud. Health (San Francisco)*. Ciudad de México.
- Miranda, S., & Lizárraga, E. (2012). Is Chitosan a Mew Pancea? Areas of Application. In *The complex World of Polysaccharides*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/62527>
- Montalvo, A., López y Palou, E. (2012). Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos, 2012, Vol. 6., 6(Parte 1).
- Montoya, P., Martínez, C., Figueroa, R., Carlos, J., Monterrubio, R., Luisa, A., & Hernández, R. (2014). Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso

Chihuahua. *Investigación Y Ciencia de La Universidad de Aguascalientes*, (62), 11–16.

Moraes Da Fonseca, L. (University of W. (1999). *Fraction of Whey Proteins by Complex Formation and membrane filtration*. University of Winsconsin.

Mounsey, J. S., O'Kennedy, B. T., Fenelon, M. A., & Brodkorb, A. (2008). The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.006>

Mukhopadhyay, R., Talukdar, D., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2003). Whey processing with chitosan and isolation of lactose, 39, 381–385. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00126-2)

Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., & Guerrero, P. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087> 0141-8130/©

Nelson, D., & Cox, M. (2008). *Lehninger Principios de Bioquímica* (5th ed.). New York: Freeman.

NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. (n.d.). DOF - Diario Oficial de la Federación. Retrieved from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010

Onwulata, C., & Huth, P. (2008). *Whey Processing, Functionality and Health benefits* (1st ed.). Ames, Iowa: Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologies.

Pérez, M., & Sánchez, M. (2012). *Estudio de las proteínas presentes en la membrana del glóbulo graso de la leche de vaca y oveja Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los*. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.

Plata, A., Ramírez, S., Elías, C., & Luna, R. (2013). Valor agregado para el lacto suero de caprino proveniente de agroindustrias lácteas : ácido láctico como alternativa de descontaminación. *NOVA. Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 11(19).

Poveda E., E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397–403. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>

Ramírez-Nolla, S., & Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Queso Oaxaca: panorama del proceso de elaboración, características fisicoquímicas y estudios recientes de un queso típico mexicano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Amorim, M. M., Fernandes, J. C., Lopes-da-Silva, J. A., ... Malcata, F. X. (2012). Effect of composition of commercial whey protein

- preparations upon gelation at various pH values. *Food Research International*, 48(2), 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.004>
- Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2016). *Whey and Whey Powders: Production and Uses. Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00747-9>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Riquelme Gyimesy, L. F. (2015). Desarrollo Por Ultrafiltración De Un Concentrado Proteico a Partir De Lactosuero. *PhD Proposal*, 1, 1–48. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos* (1st ed.). Madrid: Editorial Hélice.
- Rodriguez, M.; Durán, R. (2011). Los quesos de México y el mundo. Retrieved February 22, 2017, from http://www.hablemosclaro.org/Temas/4/28/Los_Quesos_de_México_y_del_Mundo#.VsvKh_nhDIU.
- Rombaut, R., Dejonckheere, V., & Dewettinck, K. (2007). Thermocalcic Aggregation of Milk Fat Globule Membrane Fragments from Acid Buttermilk Cheese Whey. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1662–1673. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-587>
- Romero, N. (2006). Métodos de Análisis para la Determinación de Nitrógeno y Constituyentes Nitrogenados en Alimentos. *Producción Y Manejo De Datos De Composición Química De Alimentos En Nutrición*, 0, 165–230.
- Santos, M. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2012). Fractionation of the major whey proteins and isolation of ??-Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. *Separation and Purification Technology*, 90, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.02.030>
- Savant, V. D., & Torres, J. A. (2000). Chitosan-Based Coagulating Agents for Treatment of Cheddar Cheese Whey. *Biotechnology*, 16, 1091–1097. <https://doi.org/10.1021/bp0001260>
- Sbodio, O.; Revelli, & G. (2012). Coagulación de la leche . Desarrollo de un dispositivo para el “ monitoreo ” online del proceso . *Avances en la Argentina*, 38, 236–246.
- Schaller, A. (2012). Cadenas alimentarias, sueros de lechería. Retrieved February 12, 2016, from http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/44/cadenas/r44_06_Suer oLacteo.pdf
- Schilimme, E., & Wolfgang, B. (2005). *La leche y sus componentes. Propiedades físicas y*

- químicas. (T. Verlag, Ed.) (2°). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Segal, C. ; Ortega, C. (2005). *Manual de Practicas Biología Molecular de la Celula 1* (1ed.). Facultad de Ciencias UNAM.
- Smith, S. (2015). Global Whey Protein Market - Growth, Trends And Forecast (2015-2020). Retrieved from <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-whey-protein-market--growth-trends-and-forecast-2015-2020-300155575.html>
- Solís, M. (2011). Análisis fisicoquímico y bacteriológico del suero de leche obtenido durante la producción de diversos tipos de queso y recuperación de lactosa del mismo.
- Souza, R., Gimenes, M., & Costa, S. (2008). Eliminación de Grasas del Suero de Queso para Obtener Proteínas y Lactosa. *Infromación Tecnológica*, 19(2), 41–50.
- Stuart, M. C., de Vries, R., & Lyklema, H. (2005). 2 Polyelectrolytes. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, 5(C), 1–84. [https://doi.org/10.1016/S1874-5679\(05\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S1874-5679(05)80006-6)
- Synowiecki, J., & Al-khateeb, N. A. (2010). Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives, (November 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Tavares, T., & Malcata, F. X. (2016). *Whey and Whey Powders: Protein Concentrates and Fractions. Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00748-0>
- Teniza, O. (2008). *Estudio del suero de queso de leche de vaca y propuesta para el reuso del mismo*. Instituto Politécnico Nacional.
- Thompson, A., Boland, M., & Singh, H. (2009). *Milk Proteins: From Expression to food*. New York: Elsevier.
- Townend, R. E. (1978). Coprecipitation of acid cheese whey and tannery waste and recovery of protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(4), 589–599. <https://doi.org/10.1002/bit.260200410>
- Uribe, L., María, M., Valencia, S., Uriel, J., Monzón, H., Eduardo, J., ... Suescún, P. (2008). INOCULADA CON *Lactobacillus casei* INOCULATED WITH *Lactobacillus casei*.
- Vakili, M., Rafatullah, M., Salamatinia, B., Abdullah, A. Z., Ibrahim, M. H., Tan, K. B., ... Amouzgar, P. (2014). Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 113, 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.007>
- Valencia, E., & Ramírez, M. (2010). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Ciencia Y Cultura: Elemento.*, 365–367.

- Veisseyre, R. (1972). *Lactología técnica. Recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Zaragoza: Acribia.
- Ventura, P. (1996). Lipid lowering activity of chitosan, a new dietary integrator. *Chitin Enzymology*, 55–62.
- Villegas, A. (2004). *Tecnología quesera*. México: Editorial Trillas.
- Wang, H., Pampati, N., McCormick, W. M., & Bhattacharyya, L. (2016). Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(6), 1851–1857. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.039>
- Wijayanti, H. B., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2014). Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105>
- Wu, S.-J., Liou, T.-H., Yeh, C.-H., Mi, F.-L., & Lin, T.-K. (2013). Preparation and characterization of porous chitosan-tripolyphosphate beads for copper(II) ion adsorption. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(6), 4573–4580. <https://doi.org/10.1002/app.38073>
- Wypych, G. (2016). Chitosan. *Handbook of Polymers*, 54–56. <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-92-8.50019-7>
- Y.H.Hui. (1993). *Dairy Science and Technology Handbook 1 Principles and Properties Dairy Science and Technology Handbook*. Wiley.
- Yan, H., Yang, L., Yang, Z., Yang, H., Li, A., & Cheng, R. (2012). Preparation of chitosan/poly(acrylic acid) magnetic composite microspheres and applications in the removal of copper(II) ions from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 229–230, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.014>
- Yao, K., Li, J., Yao, F., & Yin, Y. (2012). *Chitosa-Based Hydrogels. Functions and applications* (1st ed.). Boca Ratón: CRC Press.
- Zall, R. R. (1967). *The problem and potencial of 3 billion gallons of whey*. Milk Dealer.

Apéndice

A Método Bradford

A1. Reactivo de Bradford

Azul Coomasie G-250	[5 mg]
Etanol	[2.5 mL]
Ácido fosfórico	[5 mL]
Agua destilada	[hasta 50 mL]

Se mezclan el azul Coomasie, etanol y ácido fosfórico, en ese orden, una vez disueltos se afora hasta 50 ml con agua destilada y se disuelve nuevamente con agitación.

A2. Patrón de albumina

Albúmina bovina	[10 mg]
Agua destilada	[10 mL]

Se pesan mg de albúmina bovina en ml de agua destilada, esta disolución será la disolución madre con una concentración 1 ^{mg}/ml.

B SDS-PAGE

B1. Solución digestora

Tris 0.5M, pH=6.8	[4.375 mL]
SDS	[100 mg]
Glicerol	[5 mL]
2-mercaptoetanol	[0.25 mL]
Azul bromofenol	[50 mg]

B2. Buffer amortiguador de corrida pH=8.3

Trisma base	[3 mg]
Glicina	[14.4 g]
SDS 10% (ver B7)	[10 mL]
Agua destilada	[Aforar a 1L]

El regulador del tanque inferior puede ser reusado 4 o veces, sin embargo el del tanque superior se debe descartar a la primera.

B3. Solución madre para tinción de proteínas

Azul Coomasie R-250	[2 g]
Agua destilada	[200 mL]

B4. Solución teñidora para bandas de proteína Coomasie R-250 al 0.125%

Solución teñidora madre	[62.5 mL]
Metanol absoluto	[250 mL]
Ácido acético gacial	[50 mL]
Agua destilada	[137.5 mL]

B5. Solución desteñidora 1

Metanol absoluto	[100 mL]
Ácido acético gacial	[400 mL]
Agua destilada	[500 mL]

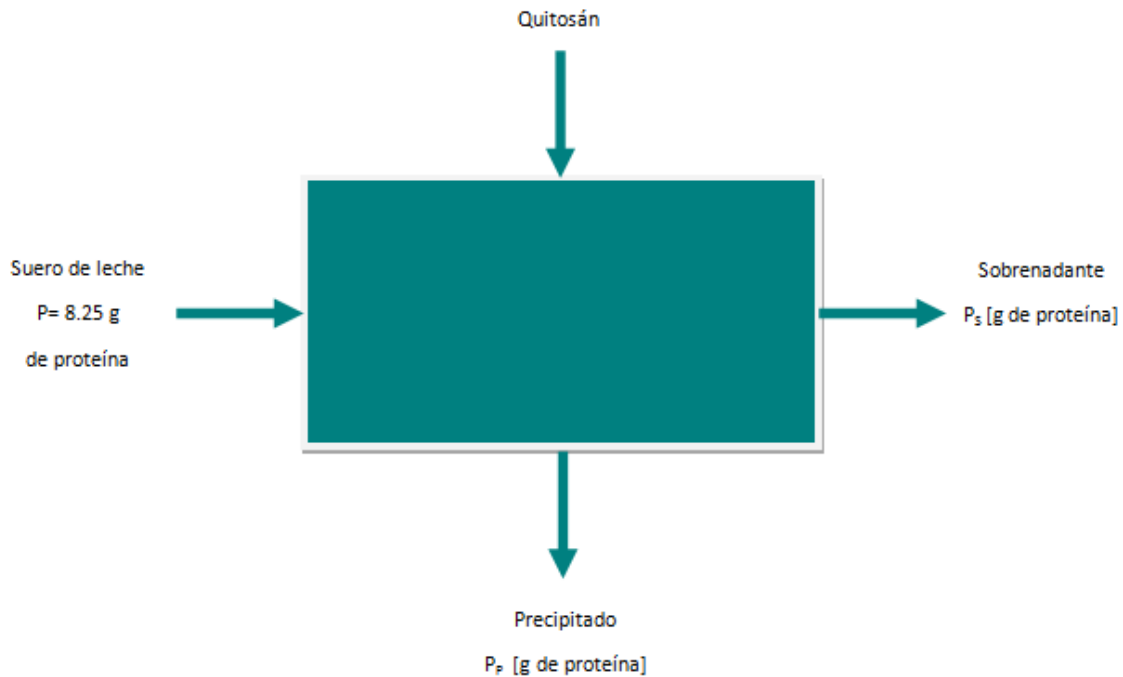
B6. Solución desteñidora 2

Metanol absoluto	[25 mL]
Ácido acético gacial	[35 mL]
Agua destilada	[440 mL]

B7. Lauril sulfato de sodio (SDS 10%)

SDS	[10 g]
Agua destilada	[90 mL]

C Cálculo de rendimiento



Balance de fracción de proteína:

$$\begin{aligned} \text{Entrada} &= \text{Salida} \\ 8.25 \text{ g de proteína} &= P_p + P_s \end{aligned}$$

Despejando P_p

$$P_p = (8.25 \text{ g } P) - P_s$$

Donde:

8.25 g de proteína, que se sabe por determinaciones anteriores que contiene 1 L suero de leche inicial.

P_p = Cantidad de proteína del precipitado [g]

P_s = Cantidad de proteína del sobrenadante [g]

Dada la concentración en g/L, obtenida por el método de Bradford, y para facilitar los cálculos, se supone una pérdida mínima de líquido, por lo tanto 1 L de solución (sobrenadante), así se calcula la cantidad de proteína, multiplicando la concentración por 1.

Para la corrida 1, donde la concentración es 4.496 g/L

$$P_s = 1L * 4.496 \frac{g}{L} = 4.496 \text{ g de proteína}$$

Sustituyendo P_s

$$P_p = 8.25g - 4.496 g$$

$$P_p = 3.754 g$$

Se sabe que la masa total en la corrida 1 fue de 4.261g, entonces el porcentaje total de proteína se calcula:

$$\%P = \frac{3.754 \text{ g de proteína}}{4.261 \text{ g de precipitado}} * 100 = 88.087 \%$$

Calculando la cantidad de proteína obtenida por este método de recuperación, se puede calcular el rendimiento con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Proteína extraída}}{\text{Proteína en el suero de leche}} * 100$$

Para la corrida 1:

$$\text{Rendimiento} = \frac{3.328 \text{ g de proteína}}{8.25 \text{ g de proteína}} * 100$$

$$R_1 = 40.335 \%$$